



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Oddělení molekulární biologie a patologie buňky

Marián Liberko

**Neinvazivní prenatální diagnostika na
bázi přítomnosti fetálních nukleových
kyselin v mateřské cirkulaci**

Non-invasive prenatal diagnosis based on the presence
of
extracellular fetal nucleic acids in maternal circulation

Diplomová práce

Praha 2010

Autor práce: Marián Liberko

Studijní program: Všeobecné lékařství

Vedoucí práce: **Doc. RNDr. Ilona Hromadníková, PhD.**

Pracoviště vedoucího práce: **Oddělení molekulární biologie a patologie
buňky**

Datum a rok obhajoby: 20.1.2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracoval samostatně a použil jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 4. ledna 2010

Marián Liberko

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce doc. RNDr. Iloně Hromadníkové PhD. za rady a připomínky, které mi usnadnily psaní této diplomové práce.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	6
ÚVOD.....	8
1. STANDARDNÍ PRENATÁLNÍ DIAGNOSTIKA.....	10
2. FETÁLNÍ NUKLEOVÉ KYSELINY (CFFDNA, CFFRNA) V MATEŘSKÉ CÍRKULACI.....	11
2.1. PŘÍTOMNOST CFFDNA V CÍRKULACI MATKY	12
2.1.1 Původ cffDNA v cirkulaci matky.....	12
2.1.2 Kvantitativní zastoupení cffDNA v mateřské plazmě a séru	13
2.1.2.1 Metody ke zvýšení frakčních koncentrací cffDNA	14
2.1.3 Epigenetické markery k specifické detekci cffDNA v mateřské cirkulaci.....	15
2.1.4 Clearance cffDNA z mateřské cirkulaci.....	17
2.2. CFFRNA V MATEŘSKÉ CÍRKULACI.....	18
3. VYUŽITÍ FETÁLNÍCH NUKLEOVÝCH KYSELIN V KLINICKÉ DIAGNOSTICE	19
3.1. DETERMINACE POHLAVÍ PLODU ANALÝZOU CFFDNA.....	19
3.2. NEINVAZIVNÍ FETÁLNÍ RHD A RHCE GENOTYPIZACE Z MATEŘSKÉ PLASMY	21
3.3. DETEKCE CHROMOSOMÁLNÍCH ANEUPLOIDIÍ ANALÝZOU FETÁLNÍ DNA V MATEŘSKÉ CÍRKULACI.....	25
3.4. DETEKCE AR/AD ONEMOCNĚNÍ PLODU ANALÝZOU FETÁLNÍ DNA V MATEŘSKÉ CÍRKULACI.....	32
3.4.1 Kongenitální adrenální hyperplazie (CAH).....	32
3.4.2 Cystická fibróza	33
3.4.3 β -thalasémie.....	34
3.4.4 Huntingtonova nemoc.....	35
3.4.5 Myotonická dystrofie	37
3.4.6 Achondroplázie.....	37
ZÁVĚR.....	39
SOUHRN.....	41
SUMMARY.....	42
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	43

Seznam zkratek

AC – abdomen circumference

ACTH – adrenokortikotropní hormon

AFP – α -feto protein

AMC – amniocentesis

AR – allelic ratio

cffDNA - cell free fetal deoxyribonucleic acid

cffRNA - cell free fetal ribonucleic acid

CAH – congenital adrenal hyperplasy

CFTR – cystic fibrosis transmembrane regulator

CVS – chorious villi sampling

CRH – corticotropin-releasin hormone

CRL - cranium rumph lenght

EAR – epigenetic allelic ratio

FISH – fluorescent in situ hybridization

FL – femur lenght

free β hCG – free β human chorionic gonadotropin

GE – genome equialents

HC – head circumference

hCG – human chorionic gonadotropin

hME assay – homogenous massEXTEND assay

hPL – human placental lactogen

LDH – laktátdehydrogenáza

MALDI-TOF MS – matrix assisted light desorption/ionization-time of flight mass spectrometry

mRNA – messenger ribonucleic acid

NIPD – noninvasive prenatal diagnosis

NB - nasal bone

NT – nuchal translucency

PAPP-A – pregnancy associated plasma protein A

PCR – polymerase chain reaction

RCD – relative chromosome dosage

RT-PCR – real-time polymerase chain reaction

SABER assay – single allele base extension reaction assay

SNP – single nucleotide polymorphism

SPRT – sequence probability ratio test

SRY – sex region of Y-chromosome

STD – sequence tag density

tcfDNA – total cell free deoxyribonucleic acid

uE3 – unconjugated estriol

UZ - ultrazvuk

VVV – vrožené vývojové vady

ZFY – zinc finger protein

Úvod

Cílem této diplomové práce je podat přehled současných možností neinvazivní prenatalní diagnostiky (NIPD), která jako materiál k vyšetření využívá volné nukleové kyseliny plodu (cffDNA, cffRNA), přítomné v mateřské cirkulaci.

Standardní součástí prenatalní diagnostiky u každého těhotenství je ultrazvukové vyšetření plodu a biochemický screening z krve matky v II. trimestru a u některých těhotenství rovněž v I. trimestru. V případě patologických nálezů je těhotná indikována k invazivnímu vyšetření (AMC, CVS, kordocentéza...) s cílem potvrdit nebo vyloučit suspektní patologii.

Každá z výše zmíněných metod (AMC, CVS, kordocentéza...) představuje určité riziko potratu plodu. Byly a jsou proto hledány metody, jak potvrdit nebo vyloučit patologické nálezy zjištěné pomocí UZ a biochemického screeningu pro minimalizaci rizika pro matku a plod.

NIPD na bázi přítomnosti fetálních nukleových kyselin v mateřské cirkulaci umožňuje takovou diagnostiku. Vzhledem k tomu, že se odebírá venózní krev matky, riziko pro plod nebo matku není větší než při odběru krve z jiných příčin a je proto prakticky zanedbatelné.

V současnosti jsou tyto metody využívány k určení pohlaví plodu u těhotenství v riziku X-recesivně vázaných chorob jako hemofilie, Duchennova muskulární dystrofie, atd. a tím umožňují snížit potřebu invazivních zákroků – indikace pouze u těhotenství s plodem mužského pohlaví. Jinou klinickou aplikací této metody je určení pohlaví plodu u těhotenství s rizikem kongenitální adrenální hyperplazie (CAH) a rozhodnutí o vedení fetální terapie v závislosti na pohlaví plodu. Další možností je určení RHD, RHCE genotypu plodu u RhD, RhCE negativních matek, detekce chromozomálních aneuploidií a autozomálně recesivních (AR) a autozomálně dominantních (AD) chorob. V detekci těchto stavů jsou užívány metody: real-time PCR, digital PCR, matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) a shotgun sequencing.

V následujících oddílech bude podána jednak základní charakterizace cffDNA, její původ, její kvantitativní a kvalitativní charakteristiky za

fyziologického stavu a za stavu patologického, její kinetika v organismu matky, možnosti odlišení fetální a mateřské volné DNA, jednak využití cfDNA k NIPD ve výše zmíněných klinických aplikacích, spolu se zmínkou o typu použité metody.

1. Standardní prenatalní diagnostika

V průběhu gravidity žena podstoupí zpravidla 4 UZ vyšetření. První vyšetření se provádí v 6.-8.týdnu, počítáno od prvního dne následujícího od poslední menstruace. Hlavním účelem je vyloučení mimoděložního těhotenství a určení počtu zárodků. Druhé vyšetření v 11.-13. týdnu umožňuje určit přesné stáří plodu změřením tzv. temenokostříční délky (CRL). Dále se měří prosáknutí záhlaví-nuchální translucence (NT) a nosní kůstka (NB). Za fyziologickou se považuje NT do 3 mm. Větší hodnoty jsou spojeny s rizikem trizomií 21, 18, 13 a některými vrozenými vývojovými vadami (VVV). Obdobně, nepřítomnost, nebo zkrácená NB je spojena s rizikem VVV. Třetí UZ v 20.-22. týdnu umožňuje zobrazit rozměry plodu a některé jeho orgány. Měří se obvod hlavičky (HC), obvod břicha (AC), délka stehenní kosti (FL). Lze hodnotit množství plodové vody a uložení placenty. Čtvrté UZ se provádí v 30.-32. týdnu a jeho cílem je podobně jako v předchozím biometrie, dále se hodnotí stav a umístění placenty a množství plodové vody.

UZ vyšetření je doplněno biochemickým screeningem z krve matky. V I. trimestru (10-12. týden) se stanovuje PAPP-A a free β hCG. Nízké hladiny jsou charakteristické pro trizomii 21. Standardně se provádí tzv. tripple test v II. trimestru (mezi 16.-18. týdnem), v rámci kterého se stanovují hladiny AFP, hCG a uE3. Nízký AFP, zvýšený hCG a nízký uE3 představují riziko narození plodu s trizomií 21. Nízký AFP, hCG, uE3 znamenají riziko postižení plodu trizomií 18. Izolovaně zvýšený AFP je markerem VVV nekrytých kůží, např. defektu uzávěru neurální trubice.

Patologické nálezy v rámci prenatalní diagnostiky, či už ultrasonografické, nebo biochemické jsou indikací k provedení invazivních vyšetření majících za cíl potvrdit nebo naopak vyvrátit předpokládanou malformaci. Kromě patologického UZ a biochemického nálezu jsou absolutní indikací k invazivním metodám taky věk matky nad 35 let, balancovaná chromozomální aberace u jednoho z rodičů a vypočítané riziko větší než 1:300. Za relativní indikaci je považován věk otce nad 50 let a psychologická indikace u žen s předchozím těhotenstvím postiženým numerickou chromozomální abnormalitou.

Z invazivních metod je užívána amniocentéza (AMC). Při standardní AMC se odebírá plodová voda mezi 16.-18. týdnem. Jedná se o metodu bezpečnou, riziko fetálních ztrát je do 0,5 %. Tzv. časná AMC se provádí v rozmezí 10.-13. týdne, ale je spojena s vyšším rizikem. Fetální ztráty jsou 2-3 %. U obou případů po odběru následuje kultivace a následně cytogenetická analýza. Jinou metodou je biopsie choriových klků (CVS), lze ji provést již v 10.-11. týdnu. Nevýhodou je jednak vyšší riziko fetálních ztrát (1%) v porovnání s AMC, jednak riziko diskrepance mezi karyotypem buněk klků a buněk plodu vzhledem k tomu, že je vyšetřována extraembryonální tkáň, co může vést jak k falešně pozitivním, tak falešně negativním výsledkům. Výsledky je proto nutné ověřit AMC, nebo kordocentézou, při které se odebírá krev z klíčky pupečníku. Je to metoda vhodná při pozdním zachytu defektu na UZ, ověření nejasného výsledku AMC, nebo ověření patologického nálezu CVS. Fetální ztráty se pohybují v závislosti na zkušenosti v rozmezí 2-5 %. V pozdním II. a ve III. trimestru lze provést placentární biopsii. Indikace jsou obdobné těm při kordocentéze a nevýhody těm u CVS. K invazivním metodám se řadí taky rychlé karyotypování na nekultivovaných amniocytech za použití FISH metody. Detekuje specifické aneuploidie, neodhalí strukturální aberace.

2. Fetální nukleové kyseliny (cffDNA, cffRNA) v mateřské cirkulaci

Placenta, resp. placentární membrána tvoří částečně permeabilní bariéru mezi matkou a plodem, která umožňuje průnik některých látek a také fetálních buněk do mateřské cirkulace a obráceně, tedy průnik mateřských buněk do cirkulace plodu (Lo et al., 1996). Tyto buňky byly studovány k jejich využívání jako materiál pro NIPD (Walknowska et al., 1969, Herzenberg et al., 1979, Lo et al., 1989, Bianchi et al., 1990). Hlavní limitací této metody je nízký počet fetálních buněk v mateřské cirkulaci, přibližně 1 buňka/1ml mateřské krve (Bianchi et al., 1997).

Průkaz přítomnosti tumor-derivované DNA v séru a plazmě u pacientů s nádorovým onemocněním (Chen et al., 1996, Nawroz et al., 1996, Anker et al.,

1997, Mutirangura et al., 1998, Wong et al., 1999) vedl k zájmu, zda-li je možné obdobně detekovat cffDNA v cirkulaci matky.

2.1. Přítomnost cffDNA v cirkulaci matky

Lo et al., 1997, jako první prokázali přítomnost cffDNA v mateřské cirkulaci. Jako marker pro detekci cffDNA byl zvolen SRY gen lokalizovaný na Y-chromozomu. Vzorky plasmy a séra byly získány od 43 těhotných mezi 12.-40. týdnem těhotenství. 30 plodů bylo mužského pohlaví, 13 plodů bylo ženského pohlaví. Y pozitivní signály byly detekovány ve 24 (80 %) vzorcích plasmy a ve 21 (70 %) vzorcích séra u těhotných s plodem mužského pohlaví. Žádná z 13 těhotných s plody ženského pohlaví a žádná z 10 netěhotných neměly Y pozitivní signály, specifita byla 100%.

2.1.1 Původ cffDNA v cirkulaci matky

Na přítomnosti cffDNA v mateřské cirkulaci se podílí jednak fetální hematopoetické buňky, jednak placenta a přímý přestup cffDNA transplacentárně (Bianchi et al., 2004).

Hematopoetické buňky plodu uvolňují cffDNA do cirkulace matky v důsledku jejich destrukce po průniku placentou. Tento zdroj cffDNA představuje pouze malé procento z celkové cffDNA, vzhledem k nízkému počtu fetálních buňek (1 fetální buňka/1ml mateřské krve – Bianchi et al., 1997) proniknuvších do oběhu matky. Druhým minoritním zdrojem cffDNA, vedle hematopoetických buňek, je přímý transfer cffDNA přes placentu.

Hlavním zdrojem cffDNA v krvi matky jsou apoptoticko/nekrotické změny buňek trofoblastu placenty (Flori et al., 2004, Tjoa et al., 2006, Alberly et al., 2007). Tjoa et al. zkoumali vliv placentární hypoxie na množství uvolněné cffDNA. Placenty po porodu byly kultivovány v normoxických (10% O₂) podmínkách po dobu 20 hodin a hypoxických (0,5 % O₂) podmínkách po dobu 1 hodiny. Signifikantně vyšší koncentrace cffDNA byly naměřeny v souboru vystaveném hypoxii. Uvolnění cffDNA bylo spojeno se zvýšenou apoptózou (potvrzeno zvýšenou aktivací caspasy 3 na Western blotting), nekrózou (potvrzeno zvýšením koncentrace LDH v supernatantu). Tyto změny byly

imunohistochemicky lokalizovány na syncytiotrofoblastu. Rápidní zvýšení cffDNA v průběhu posledních týdnů těhotenství (Lo et al., 1998, Chan et al., 2003) je pravděpodobně důsledkem vystupňovaného oxidativního stresu jako následek kolísání v placentární perfuzi. Dále, pro účast apoptotických a nekrotických změn trofoblastu, resp. syncytiotrofoblastu na zvýšeném uvolňování cffDNA svědčí taky více než pětinasobný vzestup cffDNA u preeklampsie, která je s těmito procesy spojena (76 GE/ml u fyziologických těhotenství, 381 GE/ml u preeklampsie), údaje dle Lo et al., 1999.

2.1.2 Kvantitativní zastoupení cffDNA v mateřské plazmě a séru

Lo et al., 1998 vyvinuli real-time PCR pro měření cffDNA v mateřské cirkulaci. Krevní vzorky byly odebrány v časném stadiu (11.-17. týden) a v pozdním stadiu (37-43. týden) těhotenství.

Koncentrace β -globinu v plazmě/séru byla použita k měření celkové DNA (fetální a mateřské). Pro β -globínové sekvence v plazmě všech těhotných bylo naměřeno průměrně 3 446 kopií/ml (medián 1 594 kopií/ml, rozsah 356-31 875 kopií/ml). V séru byly tyto hodnoty: průměrně 50 651 kopií/ml (medián 34 688 kopií/ml, rozsah 5 813-243 750 kopií/ml). V časném těhotenství bylo naměřeno průměrně 986 kopií/ml (medián 975 kopií/ml, rozsah 356-1 856 kopií/ml). V pozdním těhotenství bylo naměřeno průměrně 5 945 kopií/ml (medián 4 313 kopií/ml, rozsah 1 125-31 875 kopií/ml).

K měření cffDNA byl užit SRY gen Y chromozomu, jako fetálně specifický marker. Pro tento marker bylo v plazmě naměřeno v časném těhotenství průměrně 25,4 kopií/ml (medián 20,6 kopií/ml, rozsah 3,3-69,4 kopií/ml). V séru bylo v časném těhotenství naměřeno průměrně 28,7 kopií/ml (medián 19,5 kopií/ml, rozsah 4,0-58,1 kopií/ml). Pro pozdní těhotenství bylo naměřeno průměrně v plazmě 292,2 kopií/ml (medián 244,0 kopií/ml, rozsah 76,9-769 kopií/ml), v séru průměrně 342,1 kopií/ml (medián 286,0 kopií/ml, rozsah 33,8-900 kopií/ml). Frakční koncentrace cffDNA v plazmě v časném těhotenství je průměrně 3,4 % (rozsah 0,39 %-11,9 %) a průměrně 6,2 % (rozsah 2,33 %-11,4 %) v pozdním těhotenství. Pro sérum jsou frakční koncentrace

cffDNA v časném těhotenství průměrně 0,13 % (rozsah 0,014 %-0,54 %) a průměrně 1,0 % (rozsah 0,032 %-3,97 %). Hodnoty dle Lo et al., 1998.

Údaje vykazují signifikantní vzestup koncentrací jak celkové DNA, tak cffDNA v pozdním těhotenství v porovnání s těhotenstvím časným. Příčiny vzestupu obou koncentrací nejsou přesně známy. Předpokládá se, že příčinou může být zvětšující se fetomaternální komunikace v průběhu těhotenství a omezení clearance DNA jako součást fyziologických změn v průběhu těhotenství (Lo et al., 1998).

Hromadníková et al., 2007 zkoumali kvantifikaci jak celkové (tcfDNA), tak fetální (cffDNA) u fyziologických těhotenství a u těhotenství s placentární dysfunkcí. Studie zahrnovala těhotné s placentární dysfunkcí (skupina A), těhotné s abnormálním biochemickým screeningem a normálním UZ nálezem (skupina B) a těhotné s normálním biochemickým UZ nálezem (skupina C). Výsledky studie prokázaly signifikantně vyšší množství jak tcfDNA, tak cffDNA u těhotenství s placentární dysfunkcí v porovnání s kontrolami.

Signifikantně vyšší koncentrace cffDNA byly naměřeny u žen s předčasným porodem (Leung et al., 1998), dále u těhotenství s placenta praevia (Sekizawa et al., 2002), hyperemesis gravidarum (Sekizawa et al., 2001) a u těhotenství s invazivní placentací (Sekizawa et al., 2002). Tyto klinické korelace tedy naznačují, že zdrojem cirkulujících cffDNA je placenta (Bianchi et al., 2004).

2.1.2.1 Metody ke zvýšení frakčních koncentrací cffDNA

Frakční koncentrace cffDNA v mateřské krvi je determinována poměrem mezi absolutní koncentrací cffDNA k absolutní koncentraci celkové (fetální a mateřské) volné DNA.

Vzhledem k relativně nízkým frakčním koncentracím cffDNA, byly hledány metody jak tyto koncentrace zvýšit. Jednou z těchto metod je užití formaldehydu s cílem redukovat lýzu buněk a uvolnění DNA, a tak zvýšit frakční koncentraci cffDNA (Dhallan et al., 2004). Dhallan et al. v první fázi analyzovali vzorky krve 10 těhotných jednak bez inkubace s formaldehydem, jednak vzorky inkubované s formaldehydem. Průměrná frakční koncentrace u vzorků neinkubovaných s formaldehydem byla 7,7 % (rozsah 0,32 %-40,0 %), zatímco

průměrná frakční koncentrace vzorků inkubovaných s formaldehydem byla 20,2 % (rozsah 1,6 %-40,0 %). Ve druhé fázi analyzovali 69 vzorků po inkubaci s formaldehydem a medián frakční koncentrace byl 25 % (rozsah 3,1 %-50 %), průměrný obsah cffDNA byl 66,1 kopií/ml, což představuje 2,6-násobný vzestup proti průměru 25,4 kopií/ml (Lo et al. 1998). Tyto výsledky nebyly potvrzeny jinými skupinami (Chinnapapagari et al., 2005, Chung et al., 2005).

Jiným přístupem ke zvýšení frakčních koncentrací cffDNA je separace DNA izolované z krve matky dle její velikosti (Chan et al., 2004). Chan et al. zkoumali velikostní distribuci mateřské a cffDNA. K měření velikostní distribuce mateřské DNA použili gen pro leptin. SRY gen Y chromozomu byl použit k měření velikostní distribuce cffDNA. Medián koncentrací pro gen kódující leptin s užitím primerů produkujících fragmenty délky 392 bp byl 32 %. Medián koncentrací pro SRY gen Y chromozomu byl 20 % při použití primerů produkujících fragmenty o délce větší než 193 bp a 0 % při užití primerů produkujících fragmenty o délce větší než 313 bp. Fragmenty cffDNA v mateřské cirkulaci jsou kratší než fragmenty mateřské DNA a medián 99 % cffDNA je kratší než 313 bp. Všechny údaje dle Chan et al., 2004. Tyto výsledky byly potvrzeny dalšími skupinami (Li et al., 2004, Hromadníková et al., 2006).

2.1.3 Epigenetické markery k specifické detekci cffDNA v mateřské cirkulaci

Vzhledem k tomu, že plod a matka sdílejí zhruba 50 % genetické informace, diagnostika využívající cffDNA jako materiál byla dlouho omezena na detekci genů, nebo mutací, které plod zdědil po otci, a které tedy jsou geneticky odlišitelné od DNA sekvencí matky (např. Y chromozom, gen pro RhD antigen u RhD negativních matek). S cílem najít univerzální marker cffDNA, který by byl detekovatelný ve všech těhotenstvích, nezávisle na pohlaví plodu, byl zvažován epigenetický fenomén.

Epigenetický fenomén je proces, který mění fenotyp, ale není spojený se změnami genotypu. Nejlépe popsáním epigenetickým procesem je metylace DNA (Wolffe et al., 1999). Poon et al., 2002 zkoumali možnost použít epigenetické markery ke specifické detekci cffDNA nezávisle na pohlaví plodu.

Studie byla zaměřena na IGF2-H19 lokus a SNP této oblasti. Metylační status A/G SNP této oblasti je charakterizovaný tím, že paternálně zděděná alela je metylována, maternálně zděděná alela je nemetylována. Z 39 vyšetřovaných bylo 16 heterozygotních pro A/G SNP. Z těchto 16 případů byly v 11 případech fetální metylované alely odlišné od metylovaných alel mateřských (zděděných od otce matky). K otestování zda-li odlišná metylace mezi matkou a plodem umožní přímou detekci fetální alely z mateřské plasmy, mateřská plasma těchto 11 případů byla podrobena bisulfátové konverzi s následní metylačně specifickou PCR. V 6 z 11 případů (55 %) byly touto metodou detekovány metylované paternálně zděděné alely. Tato skupina dále zkoumala možnost detekovat fetální, maternálně zděděnou DNA. Z 16 případů heterozygotních pro A/G SNP vykazoval v 8 případech (50 %) plod nemetylovanou maternálně zděděnou alelu odlišnou od nemetylované alely matky, což značí, že matka původně zdělila fetální alelu od svého otce (byla tedy metylována u matky) a následně ji předala plodu (stala se nemetylovanou u plodu). Hodnoty dle Poon et al., 2002.

První popsany univerzální marker cffDNA v mateřské cirkulaci bez ohledu na pohlaví plodu a genetické polymorfizmy byl maspin [SERPINB5-serpin pepidase inhibitor, clade B(ovalbumin), member 5] gen (Chim et al., 2005). Maspin je tumor supresorový gen exprimovaný placentou. Použitím bisulfátové konverze s následnou metylačně specifickou PCR bylo možné určit metylační status promotoru maspin genu v placentární tkáni a v krvi těhotných. Promotor maspin genu je nemetylován (U-maspin) v placentární tkáni a hustě metylován (M-maspin) v mateřské krvi. Koncentrace U-maspin pozitivně korelovaly se standardně užívaným markerem cffDNA, SRY. Pozitivní korelace mezi rychlostí clearance pro U-maspin a SRY z mateřské cirkulace po porodu potvrzují, že jejich původ je čistě fetální (Chim et al., 2005). Lokalizace SERPINB5 genu na chromozomu 18 s využitím poznatků o jeho odlišné metylaci mezi plodem a matkou byla zkoumána dále vzhledem k možnosti užít tento univerzální marker cffDNA k detekci chromozomálních aneuploidí, jako je trisomie 18 (Edwardsův syndrom), (Tong et al., 2006). Od objevení SERPINB5 markeru byly popsány další fetální epigenetické markery vhodné k detekci v mateřské plazmě, například RASSF1A [Ras association(RaGDS/AF-6) domain family 1] na chromozomu 3

(Chan et al., 2006). Analýza RASSF1A tumor supresorového genu prokázala, že promotor je hypermetylován v placentární tkáni a nemetylován v mateřské plazmě, tedy má metylační vzorec opačný než maspin gen. Pro fetální původ hypermetylovaného RASSF1A genu svědčí rychlá clearance RASSF1A po porodu, nepřítomnost v plazmě netěhotných a pozitivní korelace mezi hypermetylovaným RASSF1A a SRY (Chan et al., 2006). Další epigenetické markery byly popsány na chromozomu 21 (Chim et al., 2008). Jinou možností k detekci cffDNA nezávisle na pohlaví plodu, než je epigenetický přístup, je analýza vysoce polymorfních STR (Pertl et al., 2000). Dnes se používá k detekci fetální DNA hlavně RASSF1A gen, který je u plodu hypermetylováný, neboť nemetylováný SERPINB5 u plodu se špatně detekuje vzhledem k četným ztrátám při bisulfátové konverzi.

2.1.4 Clearance cffDNA z matěřské cirkulaci

Lo et al. studovali clearance cirkulující cffDNA po porodu. Studie na 8 těhotných s plody mužského pohlaví, které podstoupily seccio Cesarea prokázala, že 7 z 8 žen nemělo měřitelné koncentrace cffDNA 2 hodiny po porodu. Průměrný poločas pro cirkulující cffDNA byl 16,3 minuty (rozsah 4-30 minut). Pro detekci cffDNA byl použit SRY gen Y chromozomu. Údaje dle Lo et al., 1999. Rychlá clearance cffDNA naznačuje, že plazmatické nukleázy hrají jenom částečnou roli v odstraňování těchto molekul (Lo et al., 1999). Předpokládá se účast orgánů jako jsou ledviny (Botezatu et al., 2000, Lo et al., 2000), játra a slezina. Na základě těchto výsledků Lo et al. odhadli, že k udržení stabilní hladiny cffDNA musí být placentou uvolňována v množství, v jakém je z krve matky odstraňována a sice rychlostí $2,24 \times 10^4$ kopií/min. Tento rychlý obrat cffDNA snižuje riziko falešně pozitivních výsledků jako důsledek přetrvávání fetálních buněk po předchozím těhotenství (Bianchi et al., 1996) a umožňuje využití cffDNA k dynamickému monitorování fetomaternálních dějů.

2.2. CffRNA v mateřské cirkulaci

Přítomnost RNA v plasmě pacientů s nádorovým onemocněním (Lo et al., 1999, Kopreski et al., 1999, Chen et al., 2000) a průkaz cffDNA v mateřské cirkulaci (Lo et al., 1997) vedly k zájmu detekovat cffRNA z plasmy/séra matky. CffRNA v cirkulaci matky byla poprvé popsána v roce 2000 (Poon et al., 2000). Jednou z výhod plasmatické RNA je její vlastní amplifikace v procesu transkripce z DNA do množství mRNA kopií (Lo et al., 2008). Ve studii byla zkoumána přítomnost Y-chromozóm specifické ZFY mRNA s využitím RT-PCR. Z 20 žen s plody mužského pohlaví v pozdním těhotenství (rozsah 26.-40.týden), ZFY mRNA signály byly detekovány ve 13 vzorcích plasmy (63 %). Z 9 žen s plody mužského pohlaví v časném těhotenství (rozsah 11.-19.týden), ZFY mRNA signály byly pozitivní ve 2 vzorcích plasmy (22 %). Jako kontrola byla zkoumána přítomnost ZFY mRNA u těhotných s plody ženského pohlaví. Z 20 vzorků 19 bylo negativních. Jediný falešně pozitivní výsledek byl pravděpodobně důsledkem kontaminace. Údaje dle Poon et al., 2000.

Průkaz přítomnosti cffRNA v cirkulaci matky je pozoruhodný jednak vzhledem k tomu, že RNA je labilnější než DNA a jednak vzhledem k přítomnosti plasmatických ribonukleáz. Tsui et al., 2002 zkoumali stabilitu endogenní a přidané RNA v plasmě, séru. Ke kvantifikaci RNA byla užita RT-PCR pro GAPDH mRNA. Koncentrace endogenní plasmatické RNA nevykazovala signifikantní odchylky při skladování vzorků po dobu 0, 6, 24 hodin při teplotě 4 °C. Na druhé straně, po přidání komerčně dostupné RNA do plasmy, v průběhu prvních 5 sekund, RNA koncentrace poklesly z 67 605 ng/L na 116 ng/L. Po 15-sekundové inkubaci bylo nedetekovatelné více než 99 % přidané RNA. Výrazné rozdíly ve stabilitě mezi endogenní a exogenní RNA svědčí pro ochranu plasmatické/sérové endogenní RNA. Jsou zvažovány možnosti jako ochrana této RNA uvnitř apoptotických tělísek (Halicka et al., 2000), nebo vazba RNA s proteiny, lipoproteiny, fosfolipidy (Rosi et al., 1988, Stroun et al., 1978, Marsella et al., 1989, Wieczorek et al., 1985).

Předpoklad, že hlavním zdrojem cffDNA resp. cffRNA je placenta, vedl k zájmu detekovat placentou exprimované geny v mateřské plasmě. Ng et al., 2002 zkoumali přítomnost mRNA placentárně exprimovaných genů, a sice hPL a

β hCG v cirkulaci matky. Ze vzorků 10 těhotných byly jak hPL, tak β hCG detekovány ve všech případech (100 %). Dále byly měřeny koncentrace mRNA těchto genů v závislosti na stáří těhotenství. Ve vzorkách z prvního trimestru byl medián koncentrací pro hPL 2 671 kopií/ml (rozsah 375-6 217) a 1 205 kopií/ml (rozsah 566-1 927) pro β hCG. Ve druhém trimestru byl medián koncentrací pro hPL 4 784 kopií/ml (rozsah 2 679-10 139) a 0 kopií/ml (rozsah 0-125) pro β hCG. Ve třetím trimestru byl medián koncentrací pro hPL 13 869 kopií/ml (rozsah 7 829-27 434) a 0 kopií/ml (rozsah 0-0) pro β hCG. Údaje dle Ng et al., 2002. Dalším placentárně exprimovaným genem, kterého mRNA byla prokázána v mateřské plasmě, je CRH (Ng et al., 2003).

Objevení placentárních mRNA markerů, produktu genů pro hPL, β hCG a CRH, které jsou detekovatelné v cirkulaci matky, umožňuje jejich využití u všech těhotných bez ohledu na pohlaví plodu. To vedlo k snahám objevit další placentárně specifické mRNA markery. Tsui et al., 2004 analyzovali párované placentární tkáň a mateřskou krev. K detekci placentárně exprimovaných transkriptů byla použita oligonukleotidová microarray analýza. Transkripty se zvýšenou expresí v placentárních tkáních v porovnání s mateřskou krví jsou vybrány a následně měřeny prostřednictvím RT-PCR. Tímto způsobem tato skupina identifikovala další mRNA markery: TFPI2, KISS1 a PLAC1.

3. Využití fetálních nukleových kyselin v klinické diagnostice

3.1. Determinace pohlaví plodu analýzou cffDNA

Genetická výbava každého jedince se skládá ze 46 chromozomů. Z nich je 22 párů autosomů a jeden pár gonosomů. Ženské pohlaví je determinováno gonosomy XX, mužské pohlaví gonosomy XY.

Určení pohlaví plodu, je založeno na průkazu přítomnosti, resp. nepřítomnosti Y chromosomu v cirkulaci matky. Plody s Y specifickými sekvencemi jsou plody mužského pohlaví. Jejich nepřítomnost svědčí pro plod pohlaví ženského. Toto vyšetření je vhodné zejména u těhotenství s rizikem X-recesivně vázaných nemocí, jako je hemofilie, Duchennova muskulární dystrofie, X-vázaná mentální retardace, kde jsou postiženy jenom plody mužského pohlaví,

kde se recesivní alela na X chromosomu zděděném od matky projeví vždy vzhledem k tomu, že muži jsou pro X-vázané nemoci hemizygoti, tudíž i jedna recesivní alela se manifestuje ve fenotypu jedince. Plody ženského pohlaví jsou zdravé, jsou pouze přenašeči onemocnění. I když zdědí X chromosom od matky s alelou, která nese informaci o příslušné nemoci, tato se neprojeví, protože druhý X chromosom zděděný od otce danou alelu nenese, a vzhledem k recesivnímu charakteru těchto nemocí je potřeba dvou recesivních alel k manifestaci onemocnění.

Lo et al., 1997 zkoumali přítomnost cffDNA v mateřské cirkulaci. Jako marker detekce cffDNA zvolili DYS14 sekvenci na Y chromozomu. Dosáhli senzitivitu 80 % v plasmě a 70 % v séru. Specifita byla 100 %, viz kapitola 1.1.. Detekce pohlaví plodu je poměrně přesná od 7. týdne. Sekizawa et al., 2001 zkoumali detekci pohlaví v 7. týdnu těhotenství a prokázali senzitivitu 97,2 % a specifitu 100 %. Hromadníková et al., 2003 analyzovali 12 těhotných s rizikem hemofilie v 10 týdnu těhotenství. K detekci mužské cffDNA byl užit jako marker SRY gen Y chromozomu. Dosáhli jak senzitivitu, tak specifitu této metody 100 %. Obdobné výsledky byly předtím dosaženy v jiných studiích (Lo et al., 1998, Zhong et al., 2000, Costa et al., 2001, Honda et al., 2001, Hromadníková et al., 2005, Hromadníková et al., 2007). 100% senzitivita resp. specifita dovoluje zavést tuto metodu jako standardní součást prenatalní diagnostiky u těhotných s rizikem X-recesivně vázaným onemocněním plodu.

Určení pohlaví plodu následně umožňuje redukovat nutnost invazivního vyšetření, CVS, u těhotenství s plodem ženského pohlaví, tedy s karyotypem 46,XX. Jinou aplikací detekce pohlaví plodu je screeningový test s cílem rozhodnout, zda je nutné pokračovat v dexametasonové terapii u těhotenství s rizikem kongenitální adrenální hyperplazie CAH (Rijnders et al., 2001). Pro prevenci virilizace zevních genitálií plodu ženského pohlaví musí být podávána dexametasonová terapie časně po zjištění těhotenství. V případě, že žena s rizikem CAH očekává plod mužského pohlaví, dexametasonová terapie nemusí být podávána.

3.2. Neinvazivní fetální RHD a RHCE genotypizace z mateřské plasmy

Erytrocyty nesou na svém povrchu řadu antigenů, které determinují výslední genotyp, resp. fenotyp krvinky. Dle přítomnosti antigenů je rozlišováno více systémů krevních skupin. Nejznámější jsou AB0 systém a Rh systém. Dalšími systémy jsou: Kell, Lewis, Duffy, Kidd, Diego. AB0 systém je lokalizován na 9. chromozomu (9q34.2). V tomto systému jsou rozlišovány 4 různé krevní skupiny: A (AA nebo A0), B (BB nebo B0), AB (AB) a 0 (00). Význam znalosti krevní skupiny jedince je nejvíce patrný při transfuzích krve, kde podání inkompatibilní transfuze má za následek intravaskulární hemolýzu, která může mít fatální následky. Příčinou tohoto stavu jsou aglutininy (protilátky proti erytrocytárním antigenům) cirkulující v krvi. Aglutininy rozpoznávají jim odpovídající antigeny na povrchu erytrocytu s následným zahájením imunitní odpovědi vůči antigenu, který je rozpoznán jako cizí. Patofyziologicky se jedná o imunopatologickou reakci II. typu s účastí zejména IgM a následnou aktivací komplementu. IgM mají velkou molekulu, jsou to pentamery, tudíž nejsou schopny proniknout transplacentárně z krve matky do krve plodu, to znamená, že odlišné krevní skupiny mezi matkou a plodem nevedou z tohoto důvodu k rozvoji imunitní odpovědi.

Platí, že v cirkulaci jedince jsou pouze aglutininy proti antigenům erytrocytů, které nejsou přítomny na erytrocytech jemu vlastních. Jedinec s krevní skupinou A má aglutinin antiB, u skupiny B je to antiA, jedinec s AB skupinou nemá žádné aglutininy (je tedy univerzální příjemce) a jedinec s krevní skupinou 0 má jak antiA, tak antiB (je univerzálním dárcem, protože jeho erytrocyty nenesou na své membráně žádné antigeny, vůči kterým by mohla být zahájena imunitní odpověď).

Druhým nejdůležitějším krevním systémem je Rh systém, protože Rh pozitivní jedinec aloimunizuje Rh negativního jedince prostřednictvím transfuze nebo v průběhu těhotenství. Antigeny Rh systému jsou zakódovány na chromozomu 1 dvěma sousedícími geny, RHD a RHCE (1p36.11). Každý z těchto genů obsahuje 10 exonů a sdílí 94 % identických sekvencí. Jsou uloženy těsně

vedle sebe, opačně orientované (5'RHD3'-3'RHCE5'), s tím, že sense vlákno RHD je anti-sense vlákno RHCE. RHD gen kóduje protein nesoucí D antigen, RHCE gen proteiny nesoucí antigeny C/c nebo E/e. Existuje 8 různých antigenních kombinací: Dce, DCE, DcE, DCE, ce, Ce, cE, CE. Zhruba 85 % kavkazské populace je Rh-pozitivní a 15 % Rh-negativní. Rh-pozitivní mají jednu nebo dvě kopie RHD (jsou buď homozygoti DD, kteří zdělili D antigen od obou rodičů, nebo jsou heterozygoti Dd, resp. dD, kteří zdělili D antigen pouze od jednoho z rodičů). U Rh-negativních RHD není exprimován, RHCE ale většinou exprimován zůstává.

V Rh systému nejsou aglutininy antiD, antiC/E přítomny ani v krvi Rh-pozitivního, ani v krvi Rh-negativního jedince. Tvoří se pouze při podání Rh-pozitivní krve jedinci Rh-negativnímu, kdy dochází k aloimunizaci jedince a tvorbě protilátek zejména třídy IgG proti D, resp. C/E antigenům erytrocytu. Při opakovaném podání Rh-inkompatibilní krve již aloimunizovanému jedinci může dojít k reakci podobné při AB0 inkompatibilní transfuzi, pouze následky jsou mírnější.

Zásadní význam má Rh systém zejména v rozvoji hemolytické nemoci novorozenců (HDN). Závažný, často až fatální průběh má HDN zprostředkovaná antiD. Méně závažné reakce jsou působeny anti-c/C/E.

HDN je působena maternálními IgG1 a IgG3 protilátkami, předanými transplacentárně, které vznikly jako reakce na paternálně zděděné antigeny přítomné na povrchu erytrocytů plodu. Následkem vazby IgG na antigeny erytrocytů je intravaskulární hemolýza s následnou anémií, extramedulární hematopoéza vedoucí k hepatosplenomegalii plodu, hypoxie a hyperbilirubinémie plodu působící ikterus s rizikem bilirubinové encefalopatie (kernikterus). To vše může být příčinou abortu. V terapii se uplatňuje intrauterinní fetální transfuze, výměnná transfuze, fototerapie.

Význam prenatální determinace RHD genotypu plodu je zejména u RhD-negativních matek, jejichž partneři jsou heterozygotní pro RHD gen. V případě, že otec je heterozygotní pro RHD gen a matka je RhD negativní, v 50 % může být plod RhD-pozitivní s následnou aloimunizací matky a rizikem HDN pro další těhotenství. Determinace RHD a RHCE genotypu plodu s využitím cfDNA je

poměrně snadná. Determinace je založena na průkazu přítomnosti, resp. nepřítomnosti RHD genu a c/C/E alel RHCE genu (tyto alely se vyskytují u RhD pozitivních i negativních jedinců). Význam této metody determinace Rh genotypu plodu je jednak minimalizace rizika abortu v porovnání s jeho dřívější determinací invazivními metodami (CVS, AMC), jednak u plodů negativních na daný Rh antigen celkově vylučuje riziko HDN působené anti-D, anti-c, anti-C a/nebo anti-E aloprotilátkami a nutnost dalšího vyšetřování včetně invazivních procedur. Další výhodou neinvazivní determinace Rh statusu plodu je omezení aloimunizace těhotné jako důsledek fetomaternálního krvácení po invazivní proceduře. RhD-negativním ženám s detekovaným RhD-pozitivním plodem je podáván v rozmezí 28.-34. týdne anti-D imunoglobulin s cílem předejít aloimunizaci a tím minimalizovat riziko rozvoje HDN.

Byla provedena řada studií majících za cíl determinaci Rh statusu plodu u Rh-negativních těhotných. Lo et al., 1998 vyšetřovali 57 Rh-negativních žen v 7.-41. týdnu těhotenství. Z 57 plodů 39 bylo RhD-pozitivních a 18 RhD-negativních. RHD genotypizace pomocí PCR amplifikace DNA RHD exonu 10 byla správně určena u 37 z 39 (senzitivita 96 %) RhD-pozitivních plodů (potvrzeno sérologickou analýzou pupečnickové krve). Žádný z 18 RhD-negativních plodů nevykazoval RhD-pozitivní signály, specificita byla 100 %. Faas et al., 1998 užili k amplifikaci DNA RHD exon 7. Dosáhli jak senzitivity 100 % (18 z 18 RhD-pozitivních plodů dalo pozitivní signály), tak 100% specificity (žádný z 13 RhD-negativních plodů nevykazoval RhD-pozitivní signály). Obdobné výsledky byly dosaženy v jiných studiích (Zhong et al., 2000, Nelson et al., 2000, Finning et al., 2002, Costa et al., 2002, Legler et. al., 2002, Hromadníková et al., 2005).

Kromě anti-D aloimunizovaných těhotenství mohou vést k HDN taky těhotenství alloimunizována vůči C/c a/nebo E/e alele RHCE genu. HDN v těchto případech je většinou mírnějšího průběhu, i když Rh antigen c (pozor c a ne C) a E (RH3) mohou vést k závažné HDN (Finning et al., 2009).

Hromadníková et al., 2005a analyzovali 45 těhotných žen v 11.-40. týdnu těhotenství a výsledky korelovali s výsledky sérologické analýzy pupečnickové

krve po porodu. Studie byla zaměřena na fetální RHD a RHCE genotypizaci. RHD genotypizace byla provedena amplifikací RHD exonu 7, RHD exonu 10. K RHCE genotypizaci byla užita amplifikace RHCE exonu 2 (C alela) a RHCE exonu 5 (E alela). K analýze byla užita PCR v reálním čase. Analýza RHD exonu 7 a exonu 10 z mateřské plasmy byla plně shodná s analýzou pupečnickové krve v 45 z 45 (senzitivita 100 %) RhD-negativních, porodivších 24 RhD-pozitivních a 21 RhD-negativních plodů. Analýza RHCE exonu 2 byla správně provedena v 41 z 41 (senzitivita 100 %) Rhc homozygotních těhotných porodivších 17 RhC-pozitivních a 24 RhC-negativních plodů. Analýza RHCE exonu 5 byla správně provedena u 45 z 45 (senzitivita 100 %) Rhe homozygotních těhotných porodivších 7 RhE-pozitivních a 38 RhE-negativních plodů. Detekce RHD, C a E alely RHCE genu z mateřské plasmy jsou vysoce přesné a umožňují zavedení do klinické praxe (Hromadníková et al., 2005a). Tyto výsledky byly potvrzeny další studií (Hromadníková et al., 2005b).

Obdobné výsledky detekce C (23 případů, senzitivita 100 %) a E (35 případů, senzitivita 100 %) alel RHCE genu byly předtím dosaženy Leglerem (Legler et al., 2002). Tato skupina navíc správně detekovala c alelu RHCE genu u jedné Rhc-negativní těhotné. Finning et al., 2007 správně detekovali E a C alelu RHCE genu v 46/46 případů (14 správně detekovaných E-pozitivních, 32 správně detekovaných E-negativních), resp. 13/13 případů (4 správně C-pozitivní, 9 správně C-negativní), senzitivita i specifita 100 %. Ve 44 případech (senzitivita 100 %) správně detekovali c alelu RHCE genu u Rhc-negativní těhotné. Navíc detekovali K alelu KEL genu správně v 27 případech K-pozitivních plodů. Obdrželi jeden falešně negativní výsledek a žádné falešně pozitivní (senzitivita 98,6 %, specifita 100 %). Obdobně přesné výsledky byly dosaženy studií k determinaci fetální c a E alely RHCE genu (Hromadníková et al., 2007). K detekci paternální Rhc alely a RhE alely RHCE genu z mateřské plasmy je vhodný QIAamp DSP Virus kit, který zvyšuje výtěžnost cfDNA v mateřské plasmě v porovnání s QIAamp Blood Mini kit (Hromadníková et al., 2006).

3.3. Detekce chromosomálních aneuploidií analýzou fetální DNA v mateřské cirkulaci

Chromosomální aneuploidie jsou chromozomální aberace, u kterých je počet chromozomů násobkem haploidního počtu- n (trojnásobkem u triploidie- $3n$ a čtyřnásobkem u tetraploidie- $4n$), nebo je přítomen jeden chromosom navíc u trisomií, nebo jeden chromosom chybí u monosomií.

K nejčastěji se vyskytujícím aneuploidiím se řadí Downův syndrom ($47XX+21$, resp. $47XY+21$), Edwardsův syndrom ($47XX+18$, resp. $47XY+18$) a Patauův syndrom ($47XX+13$, resp. $47XY+13$).

V současnosti je k predikci výskytu těchto syndromů užíván biochemický screening ve 2. trimestru těhotenství, kde nízké AFP, zvýšené hCG a nízké uE3 představují riziko narození plodu s trizomií 21. Nízké AFP, hCG, uE3 znamenají riziko postižení plodu trizomií 18, resp. 13. Pravděpodobnost postižení plodu je dále vyšší při současném nálezu patologie (např. NT) v rámci sonografického vyšetření. Definitivní potvrzení je dále založeno na invazivních metodách jako je CVS a AMC. Vzhledem k tomu, že tyto screeningové metody detekují spíše epifenomén asociovaný s chromozomální abnormitou, než vlastní patologii a jsou spojeny s rizikem abortu (CVS a AMC), byly hledány možnosti detekce těchto vad při minimalizaci rizika pro plod a matku.

Bianchi et al., 1997 zkoumali odlišnosti v počtu fetálních buněk v cirkulaci matky u těhotenství s euploidním plodem, $46XY$ a u těhotenství s plodem postiženým chromozomální aneuploidií ($47XY,+21$). Průměrný počet fetálních buněk u žen s euploidním plodem, $46XY$, byl 19 (rozsah 0-91). U plodů s aneuploidií $47XY,+21$ byl průměrný počet těchto buněk 110 (rozsah 0,1-650), což představuje šestinásobný vzestup počtu buněk u těhotenství s aneuploidním plodem v porovnání s těhotenstvím s plodem euploidním. Po objevu cfDNA v mateřské cirkulaci (Lo et al., 1997) se diagnostika těchto aberací provádí výhradně na fetálních nukleových kyselinách přítomných v cirkulaci matky. Byl vysloven předpoklad, že zastoupení cfDNA u těhotenství s aneuploidním plodem bude vyšší v porovnání s těhotenstvím s euploidním plodem (Lo et al., 1999). Byly zkoumány vzorky mateřské plasmy z dvou center, a sice z Hong Kongu a z Bostonu. Medián koncentrací cfDNA u vzorků z Hong Kongu u těhotných

s trisomií 21 a s euploidiím plodem byl 48,2 kopií/ml a 16,3 kopií. Medián koncentrací u vzorků z Bostonu u těhotných s trisomií 21 a s euploidiím plodem byl 46,0 kopií/ml a 23,3 kopií/ml. To představuje 2,96-násobný vzestup cffDNA pro vzorky z Hong Kongu a 1,97-násobný vzestup cffDNA pro vzorky z Bostonu. Reprodukovatelnost těchto výsledků mezi populacemi v Hong Kongu a Bostonu, potvrzuje robustnost této metody (Lo et al., 1999). Tyto výsledky byly potvrzeny dalšími studiemi (Zhong et al., 2000, Lee et al., 2002, Farina et al., 2003). Na druhé straně, řada skupin neprokázala signifikantní vzestup cffDNA u těhotenství s trisomií 21 v porovnání s těhotenstvím s euploidním plodem (Hromadníková et al., 2002, Ohashi et al., 2002). Zhong et al., 2000 zkoumali kvantitativní odlišnosti v koncentraci cffDNA v cirkulaci matky u trisomie 18 (Edwardsův syndrom) a u trisomie 13 (Patauův syndrom), což je druhá, respektive třetí nejčastější chromozomální aneuploidie. Prokázali signifikantní vzestup cffDNA u těhotenství s plodem s trisomií 13 a žádný signifikantní vzestup u těhotenství s plodem s trisomií 18. Shodné výsledky publikovali Wataganara et al., 2003.

Mechanismus, kterým dochází ke vzestupu cffDNA je v současnosti nejasný. Jednou z možností mohou být abnormality placenty u plodů s trisomií 21 (Jauniaux et al., 1998, Genest et al., 1995, Kuhlmann et al., 1990). Druhou možností je zvýšený přestup fetálních buněk do mateřské cirkulace (Bianchi et al., 1997). Nízké koncentrace cffDNA u plodů s trisomií 18 mohou být důsledkem redukovaného a opožděného růstu placenty (Creasy et al., 1994).

Všechny předchozí popsané metody byly omezené jednak na těhotenství s plody mužského pohlaví, kdy kvantifikace cffDNA u těhotenství s aneuploidními, resp. euploidními plody byla založena na kvantifikaci Y-chromozom specifických sekvencí, tedy sekvencích nevyskytujících se u matky. Nové metody diagnostiky těchto aneuploidií jsou založeny na analýze nukleových kyselin, které jsou specifické pro plod. Jsou tedy aplikovatelné na všechny těhotenství bez rozdílu pohlaví plodu. Jednou z možností je analýza cffDNA, které nesou placenta specifické DNA metylační vzorce (Poon et al., 2002), jako je třeba maspin (SERPINB5) gen (Chim et al., 2005). Druhou možností je použití placentární mRNA v mateřské cirkulaci (Ng et al., 2003, Lo et al., 2007).

K objektivizaci fetální chromozomální dávky jsou užívány dva přístupy. Analýza alelického poměru (AR) a analýza relativní chromozómové dávky (RCD).

Analýza AR genetických variací daného lokusu může být použita jenom tehdy, když je plod heterozygotní pro daný lokus. Existují dvě metody analýzy AR. RNA-SNP AR a EAR. RNA-SNP AR metoda je poměr množství mRNA z dvou rozdílných alel stejného genu, lišících se v SNP u jedince heterozygotního pro daný gen. EAR metoda je obdobná RNA-SNP AR, měří se poměr koncentrací dvou alel u jedince heterozygotního pro daný gen, lišících se v SNP. Poměr je determinován z DNA a ne z RNA. AR pro euploidní plody je 1:1, pro plody s trisomií to je 1:2, resp. 2:1.

Analýza relativní chromozómové dávky (RCD) na rozdíl od analýzy AR nevyžaduje heterozygotnost plodu pro daný lokus, je vhodná taky pro plody homozygotní pro daný lokus. Princip spočívá ve stanovení poměru sekvencí lokusu mezi chromozomem trisomickým a referenčním. Pro euploidní plody je tento poměr 2:2, pro trisomický plod 3:2.

Chim et al., 2005 popsali, že promotor maspin genu je nemetylován (U-maspin) v placentární tkáni a hustě metylován (M-maspin) v mateřské krvi. Vzhledem k tomu, že maspin (SERPINB5) gen je lokalizován na chromosomu 18q21.33, byl zkoumán jako univerzální fetální marker, vhodný k diagnostice u obou pohlaví, k detekci trisomie 18 (Edwardsova syndromu), za předpokladu, že počet kopií chromosomu 18 může být odvozený na základě AR v SNP daného genu metodou EAR (Tong et al., 2006). Využití EAR metody předpokládá, že plod je heterozygotní pro daný lokus. Genotypizací byl stanoven SNP 156. nukleotidu maspin genu jako variace A/C (AAC/ACC u trisomie 18, AC u euploidního plodu). Na základě analýzy vzorků byl stanoven referenční interval EAR 0,330-3,044 pro euploidní plody, definovaný jako $\pm 1,96$ SD od průměrného U-maspin EAR u euploidních plodů. EAR všech vzorků (n=8) euploidních plodů byl z tohoto intervalu. EAR obou vzorků aneuploidních plodů byl mimo tento interval. U AAC trisomie 18 byl EAR 3,412, u ACC trisomie 18 byl EAR 0,255. Byla tedy dosažena jak senzitivita, tak specifita 100 %. Údaje dle Tong et al., 2006.

Druhou možností detekce aneuploidních plodů je tzv. RNA-SNP AR metoda. Obdobně jako u EAR vyžaduje heterozygotnost plodu pro daný SNP. Lo et al., 2007a zvolili k diagnostice trisomie 21 analýzu RNA-SNP AR pro PLAC4 mRNA, která je transkribována z chromosomu 21 a následně exprimována placentou do cirkulace matky, odkud může být použita jako univerzální fetální marker. Byly analyzovány placentární tkáně euploidních a trisomických plodů, $n=42$, resp. $n=12$, heterozygotních pro SNP (A/G variace). Referenční interval pro euploidní plody byl stanoven jako průměrný RNA-SNP AR pro euploidní plody $\pm 1,96$ SD. Rozsah referenčního intervalu byl 0,538-0,780. Všechny vzorky placentárních tkání euploidních plodů ($n=42$) byly z tohoto intervalu. U trisomických plodů všechny až na jeden ($n=11$) byly mimo tento interval. To představuje senzitivitu 91,7 % a specifitu 100 %. V další fázi byl tento postup aplikován přímo na analýzu mateřské plasmy. Studie zahrnovala 57 žen s euploidními plody a 10 žen s plody s trisomií 21. Obdobně jako při analýze vzorků placentárních tkání byl stanoven referenční interval pro euploidní plody, 0,461-0,841. Dva vzorky mateřské plasmy s euploidním plodem byly mimo tento interval. Kromě jediného vzorku všechny další vzorky mateřské plasmy s trisomickým plodem byly mimo tento interval. To představuje senzitivitu 90 % a specifitu 96,5 %. Placentární a plasmatické PLAC4 RNA-SNP AR spolu navzájem korelovaly, a tedy plasmatické RNA-SNP AR může být použito jako neinvazivní indikátor placentárního RNA-SNP AR a tím pádem i jako indikátor případné aneuploidie plodu. Bez použití RNA-SNP AR metody celkové plasmatické koncentrace PLAC4 mRNA nebyly signifikantně odlišné mezi trisomickými a euploidními plody. Všechny údaje dle Lo et al., 2007a.

RNA-SNP AR metoda byla dále použita k diagnostice druhé nejčastější aneuploidie, trisomie 18 (Tsui et al., 2009). Tsui et al. detekovali trisomii 18 analýzou RNA-SNP AR pro SERPINB2 mRNA, transkribované z chromosomu 18 a exprimované placentou do cirkulace matky. Postupovali obdobně jako ve studii Lo et al., 2007a. Tsui et al. v této studii dosáhli senzitivitu 75 % (správně detekovali 3 ze 4 trisomických plodů) a specifitu 100 % (správně detekovali 6 z 6 euploidních plodů).

Zimmermann et al., 2002 kvantifikací DNA chromosomu 21 a referenčního chromosomu 12 analýzou DNA extrahované z amniocytů detekovali 1,5-násobný vzestup v sekvencích chromosomu 21 v trisomických těhotenstvích. Tsui et al. 2005 dosáhli 100% senzitivitu a 100% specifickosti detekce trisomie 21 analýzou SNP AR pomocí hmotnostní spektrometrie ve vzorcích tkání získaných CVS.

Kromě možností prenatální diagnostiky chromozomálních aneuploidií determinací RNA-SNP AR resp. EAR s využitím hmotnostní spektrometrie, byly nedávno ve vztahu k této problematice popsány také metody využívající digitální PCR, tzv. digital RNA-SNP metoda, resp. digital RCD metoda (Lo et al., 2007b, Fan et al., 2007) a metody založené na principu shotgun sekvenování DNA (Chiu et al., 2008, Fan et al., 2008).

Lo et al., 2007b popsali možnost detekovat trisomii 21 pomocí digitální PCR, metodami digital RNA-SNP a digital RCD.

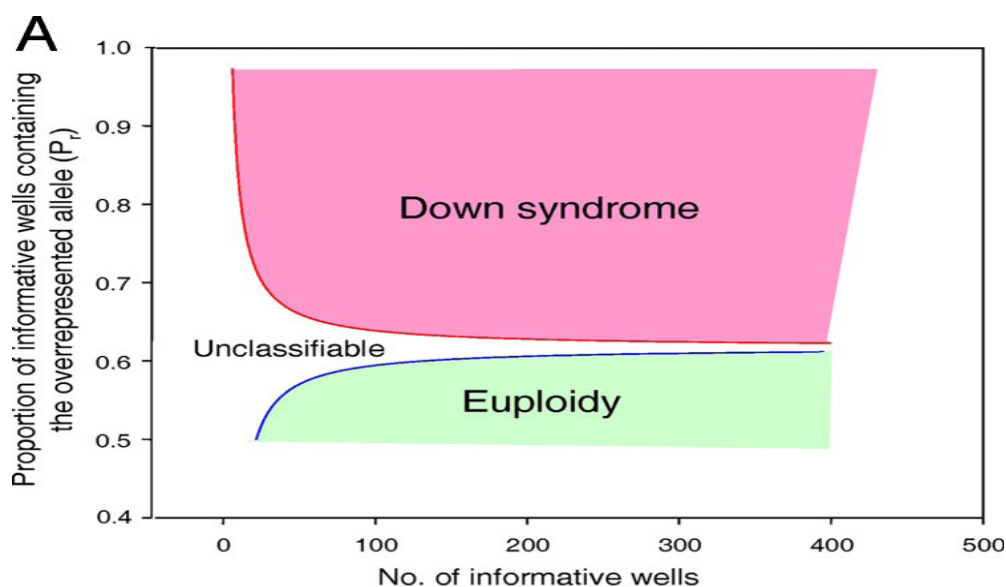
Digitální PCR probíhá na destičkách s velkým počtem jamek. Skládá se ze 3 kroků. V prvním z nich je analyzovaná DNA zředěna na koncentraci, kdy v jedné jamce je jedna templátová molekula, nebo jedna molekula na dvě jamky. V druhé fázi probíhá vlastní PCR v každé z jamek. V třetí fázi je produkt PCR reakce vizualizován pomocí hybridizace s fluorescenčními sondami, komplementárními k amplifikovanému produktu v jamce. (Vogelstein et al., 1999).

V případě metody digital RNA-SNP je po provedení analýzy PLAC4 mRNA SNP alel pomocí digitální PCR v reálném čase v 384-jamkových destičkách spočítán počet tzv. informativních jamek. Informativní jamka je definována jako pozitivní pro alelu A, nebo alelu G, ne ale pro obě současně. U euploidních plodů je poměr A-pozitivních a G-pozitivních jamek 1:1. U aneuploidních plodů je jedna z alel nadměrně prezentována, 2:1. Následně je spočítána proporce P_r nadprezentované alely ze všech informativních jamek.

V případě metody digital RCD je determinována chromosomová dávka analýzou nepolymorfního lokusu chromosomu 21 ve vztahu k lokusu na referenčním chromosomu, chromosom 1. Informativní jamka je v tomto případě definována jako jamka pozitivní pro lokus chromosomu 21, nebo lokus

chromosomu 1, ne ale pro obě současně. U euploidního plodu je počet informativních jamek pro oba lokusy přibližně stejný (poměr 2:2). U trisomie 21 jsou jamky s lokusem chromosomu 21 nadprezentovány ve vztahu k jamkám s lokusem standardního chromosomu 1 (poměr 3:2). P_r je spočítána jako proporce jamek pozitivních pouze pro lokus chromosomu 21 k celkovému počtu informativních jamek.

K určení, zda pozorovaná nadprezentace PLAC4 alely v digital RNA-SNP, nebo chromosomu 21 v digital RCD je statisticky signifikantní, byla použita SPRT analýza. SPRT je metoda umožňující testování hypotézy s postupným přibýváním dat. Nulová hypotéza je, že není přítomná alelická nebo chromozomální imbalance. Alternativní hypotéza je, že imbalance existuje. Sestrojení grafu pomocí SPRT křivek umožňuje zdefinovat vzorek jako euploidní, jako aneuploidní (trisomie 21) a jako vzorek neklasifikovatelný, vyžadující přidání další destičky k zvýšení počtu informativních jamek. Dle Lo et al., 2007b.



Kromě digitální PCR a MALDI-TOF MS v diagnostice chromozomálních aneuploidií bylo v poslední době popsáno využití metody shotgun sekvenování k diagnostice těchto aberací (Chiu et al., 2008, Fan et al., 2008).

Shotgun sekvenování je metoda nezávislá na polymorfizmech, je lokus independentní a nevyžaduje odlišení mateřské a fetální DNA a s dostatečným

počtem značek může být použita i při nízkých frakcích fetální DNA. Při shotgun sekvenování je genomová DNA fragmentována na úseky délky několika nukleotidů s následným sekvenováním daných úseků. Vzhledem k tomu, že se jedná o metodu lokus independentní, potenciálně každý DNA fragment pocházející z aneuploidního chromosomu může být využit k měření množství daného chromosomu. Fragmenty jsou dále seskupené dle svého chromozomálního původu. Následně na základě detekce zvýšené, resp. snížené exprese sekvencí daného chromosomu, může být daný vzorek klasifikován jako trisomický, resp. monozomický.

Fan et al. 2008 správně detekovali metodou shotgun 9 těhotenství s trisomií 21, 2 s trisomií 18 a jedno s trisomií 13 ve 14. týdnu těhotenství. Pro chromosomy byla stanovena hustota sekvenčních značek (STD) jako medián počtu detekovatelných sekvencí v okně o velikosti 50 kb. Dále byla vypočítána její relativní hodnota vzhledem k STD daného chromosomu z referenční genomové DNA. Pro chromosomy 21, 18, 13 byly stanoveny konfidenční intervaly relativní STD pro euploidní vzorky. U všech trisomických vzorků hodnoty STD nad horní hranici konfidenčního intervalu pro daný chromosom a byly správně detekovány jako aneuploidní, u vzorků euploidních tyto hodnoty pod hranici konfidenčního intervalu. Senzitivita a specificita byly tedy 100%.

Metodu shotgun sekvenování je možno použít taky k detekci vzácných forem aneuploidii na podkladě nebalancovaných translokací a parciálních duplikací, protože STD triplikovaných oblastí chromosomu bude vyšší než ze zbytku chromosomu. Teoreticky by bylo možné touto metodou detekovat taky inkompletní aneuploidii na podkladě mozaiky. Detekovatelnost v tomto případě závisí nejenom na koncentraci cfDNA v mateřské cirkulaci, ale taky na stupni mozaiky (Fan et al., 2008).

Chiu et al. 2008 touto metodou správně detekovali ze vzorku 28 těhotných 14 plodů s aneuploidii (trisomie 21) a 14 euploidních plodů v časně fázi těhotenství, v 14. týdnu. Pro potenciálně trisomický chromosom je vypočítána hodnota N jako počet unikátních sekvencí z daného chromosomu ve vzorku, dělený celkovým počtem unikátních sekvencí všech chromosomů. Z dané hodnoty N je vypočteno z-skóre jako počet směrodatných odchylek, kterými se hodnota N

daného chromosomu studovaného vzorku liší od referenční hodnoty pro daný chromosom (vypočítané z N pro daný chromosom z euploidních vzorků). Hranice k odlišení euploidních a aneuploidních vzorků je z-skóre 3. 14 euploidních vzorků bylo pod touto hranicí, 14 aneuploidních vzorků mělo z-skóre nad 3 (rozsah 5,03-25,11). Senzitivita a specificita 100 %.

3.4. Detekce AR/AD onemocnění plodu analýzou fetální DNA v mateřské cirkulaci

Autosomálně dominantní a autosomálně recesivní choroby jsou podmíněné přítomností defektní alely v genotypu jedince. U AD onemocnění k manifestaci postačuje jedna patologická alela alelického páru, u AR onemocnění se daná choroba projeví, jsou-li obě alely patologické (jedna od otce, druhá od matky, přičemž se může, ale nemusí jednat o stejné mutace). Detekce AD onemocnění je relativně snadná, je založena na průkazu paternálně zděděné alely, tedy alely nepřítomné v cirkulaci matky, kde její přítomnost v mateřské cirkulaci svědčí pro postižení plodu AD chorobou. Dále lze obdobně snadno detekovat de novo mutaci plodu. V případě AR onemocnění má význam negativní nález paternálně zděděné recesivně mutované alely, který vylučuje postižení plodu, za předpokladu její odlišitelnosti od recesivně mutované alely matky, nebo průkaz recesivní alely od otce, odlišitelné od recesivní alely matky, kde současná přítomnost obou alel vede k manifestaci AR onemocnění.

3.4.1 Kongenitální adrenální hyperplazie (CAH)

CAH je AR onemocnění charakterizované deficiencí enzymu 21-hydroxylázy, zodpovědné za 90 % všech CAH. 21-hydroxyláza je kódována CYP21 genem lokalizovaným na chromosomu 6p21.3. Mutace zodpovědné za deficienci 21-hydroxylázy jsou způsobeny buď delecemi nebo konverzemi, kde škodlivé mutace jsou přeneseny z blízkého pseudogenu CYP21P, který sdílí 98 % homologie s CYP21 (White et al., 2000). Méně často je příčinou CAH deficece 11- β -hydroxylázy a 3- β -hydroxysteroid-dehydrogenázy. Enzymatické defekty ve svém důsledku vedou k poruše syntézy glukokortikoidů a u tzv. formy se ztrátou soli taky k poruše syntézy mineralokortikoidů. Hromadí se prekursorů před

enzymatickým blokem jsou konvertovány v adrenální androgeny (v důsledku stimulace kůry nadledviny vysokými hladinami ACTH jako reakce na nízké hladiny kortikoidů v periférii), které u děvčat vedou k různě závažné virilizaci zevního genitálu a celkové maskulinizaci (White et al., 2000). Cílem prenatalní diagnostiky je jednak detekce pohlaví plodu (Rjinders et al., 2001, Honda et al., 2001), jednak detekce, zda je plod postižený s následným rozhodnutím o podávání dexametasonové terapie prenatalně v případě, že se jedná o plod ženského pohlaví s CAH.

Chiu et al., 2002 provedli studii s cílem potvrdit nebo vyloučit CAH u dalšího potomka manželského páru, jehož první potomek měl diagnostikovanou CAH invazivními metodami. Hypotéza byla, že přítomnost tzv. divokého typu paternálně zděděné CYP21 alely v mateřské plasmě znamená, že plod zdědil nemutovanou paternální alelu a tedy nebude manifestovat CAH. K diferenciaci mezi tzv. divokým a mutovaným typem alely byly použity vysoce polymorfní markery uvnitř CYP21. Byla analyzována DNA obou rodičů a jejich prvního potomka postiženého CAH k stanovení informativních markerů k další analýze. Byly zvoleny jak intra-, tak extragenové polymorfní markery: HLA DRB1, D6S299, D6S273, IVS2 564, IVS2 588. Haplotypy nemutovaných paternálních alel (tzv. divoký typ) byly odvozeny na základě jejich nepřítomnosti v genotypu prvního potomka. Následně byly detekovány tyto tzv. divoké typy paternálních alel v mateřské plasmě. Detekovány byly 4 z 5 paternálních markerů nezděděných postiženým plodem z prvního těhotenství, což svědčilo pro zdědění nemutované paternální alely a umožnilo vyloučit CAH. Správná detekce byla potvrzena porodem zdravého jedince ženského pohlaví, kde analýza pohlaví časně v těhotenství správně neprokázala přítomnost SRY genu.

3.4.2 Cystická fibróza

Cystická fibróza je AR onemocnění charakterizované mutacemi v CFTR genu, kódujícím transmembránový chloridový kanál. V důsledku toho je porušen transport iontů přes membrány s tvorbou abnormálně vazkého sekretu a zvýšeným obsahem chloridů v potu. Postiženy jsou exokrinní žlázy. Onemocnění je charakterizované progresivními respiračními a gastrointestinálními obtížemi,

dysfunkcí zevně sekretorické složky pankreatu, postižením jater. U mužů může být jediným projevem neplodnost na podkladu obstrukce ductus deferens vazkým sekretem.

González-González et al., 2002 detekovali postižení plodu průkazem paternálně zděděné mutace, svědčící pro cystickou fibrózu analýzou cffDNA z mateřské plasmy. Analýza vzorků rodičů prokázala, že matka je heterozygotní nosič G542X mutace a otec je heterozygotní nosič Q890X mutace. Q890X mutace je podmíněná A/G substitucí, která vytvoří restrikční místo pro enzym MseI, což je využíváno k detekci mutace. Produkt PCR reakce byl inkubován následně s MseI a fragmenty byly následně podrobeny elektroforéze. U zdravých homozygotů je přítomen 485 bp pruh v ELFO. Mutace vytvoří nové restrikční místo pro enzym a proto vzorky heterozygotních nosičů dávají tři pruhy: 485, 350 a 135 bp. Výsledky ELFO potvrdily, že plod zdědil mutaci po svém otci.

3.4.3 β -thalesémie

β -thalesémie je AR onemocnění vznikající v důsledku mutací β -globínového genu (HBB), lokalizovaného na chromosomu 11. Jedná se o tzv. hemoglobinopatii, kdy v případě β -thalesémie, β -globínové řetězce hemoglobinu nejsou přítomny vůbec β^0 , nebo jsou defektní β^+ a α řetězce jsou v nadbytku. Thalesémia minor je charakterizována mírnou mikrocytární anémií. V případě thalesémia major je přítomna těžká hypochromní mikrocytární anémie se splenomegálií. Neléčená vede k smrti do dvacátého roku života.

Chiu et al., 2002 potvrdili/vyloučili β -thalesémii major analýzou mateřské plasmy v 15. týdnu (rozsah 12.-19. týden). Nejdříve byly vytvořeny specifické primery pro detekci mutace kodonu 41/42 (-CTTT) β -globínového genu (mutace 41/42 (-CTTT) je častou příčinu β -thalesémie major v jihovýchodní Číně). Následně byl tento postup aplikován k NIPD β -thalesémie. Do studie bylo zařazeno 8 manželských párů, v kterých muž byl nosičem 41/42 (-CTTT) mutace. Mateřská plasma byla analyzována pomocí PCR se specifickými primery a v 6 z 8 případů byla detekována mutace, kterou plod zdědil od svého otce. Ve zbylých dvou případech negativní detekce paternální mutace znamenala, že plod zdědil

nemutovanou alelu od otce a v důsledku toho β -thalasémie major mohla být vyloučena.

Ding et al., 2004 k detekci β -thalasémie použili MS analýzu SNP s využitím SABER, resp. hME assay. K detekci byli zvoleny 4 nejčastěji se vyskytující mutace v jihovýchodní Asii (IVS2 654 C→T, nukleotid 28 A→G, CD 17 A→T a CD 41/42 -CTTT). Pomocí SABER assay byly správně detekovány paternální alely ve všech případech (n=11) v 7. – 21. týdnu těhotenství, hME assay dala 2 falešně negativní výsledky. Tento postup předpokládal, že rodiče budou mít odlišné mutované alely. V případě, že by oba rodiče měli stejné mutace, byla k odlišení fetální paternálně zděděné alely použita analýza SNP vážící se k mutované alele. Negativní detekce SNP vázané k mutované alele vylučuje možnost postižení plodu β -thalasémií major.

Jiný přístup k detekci paternálně zděděné mutace vedoucí k β -thalasémii zvolili Li et al., 2005. Byla zkoumána přítomnost mutací: IVSI-1, IVSI-6, IVSI-110 a kodon 39. K detekci použili frakcionaci cfDNA dle velikosti (Chan et al., 2004). Celkově bylo analyzováno 32 vzorků mateřské plasmy odebraných mezi 10. až 12. týdnem těhotenství. V studii byla dosažena senzitivita 100 % a specificita 93,8 %.

3.4.4 Huntingtonova nemoc

Huntingtonova nemoc je AD, progresivní neurodegenerativní onemocnění manifestující se motorickými projevy (chorea, dystonie), kognitivní deteriorací a psychickými symptomy. K manifestaci dochází nejčastěji mezi 40.-50. rokem života. Účinná léčba neexistuje, onemocnění vede k smrti. HD je podmíněná expanzí polymorfních (CAG)_n trinukleotidových repetitivních exonu 1 IT15 genu (huntingtin gen), lokalizovaného na chromosomu 4p16.3 (González-González et al., 2008). Manifestace onemocnění závisí na počtu repetitivních (CAG)_n. U zdravých jedinců je to 9-36 (CAG)_n, 37-86 (CAG)_n vede k manifestaci onemocnění. K expanzi premutace v mutaci dochází v důsledku meiotické instability zejména při paternální transmisi (Leefflang et al., 1999).

González-González et al., 2003a jako první správně detekovali plod s HD analýzou cfDNA v mateřské cirkulaci v 13. týdnu těhotenství s využitím

semikvantitativní fluorescenční PCR (QF-PCR). Byl vyšetřován plod těhotné, jejíž manžel trpěl HD. Analýza CAG repetice matky (analýza jaderné DNA matky) prokázala přítomnost alel (15 a 17 CAG repetice). Analýza CAG repetice u otce postiženého HD prokázala alely (16 a 40 CAG repetice). PCR analýza mateřské plasmy prokázala přítomnost tří alel: dvou normálních (15 a 17 CAG repetice) a jedné expandované (40 CAG repetice), tedy paternálně zděděné, svědčící pro postižení plodu HD. Správnost diagnózy byla potvrzena následnou analýzou CVS.

Ta sama skupina správně detekovala plod nepostižený HD obdobným postupem. PCR analýza DNA nukleární frakce matky prokázala alely (20 a 24 CAG repetice), analýza DNA otce alely (17 a 37 CAG repetice). V mateřské plasmě byly následně detekovány alely s 17, 20, 24 CAG repeticemi. Přítomnost alely s 17 CAG repeticemi nepřítomné při analýze mateřské DNA svědčí pro její paternální původ. Plod tedy zdědil od otce nemutovanou formu alely, nebyl tedy postižen HD. Správnost diagnózy byla potvrzena analýzou CVS (González-González et al. 2003b).

Bustamente-Aragones et al., 2008, správně detekovali postižený, resp. zdravý plod přímou metodou (měřením expanze CAG repetice) u 3 ze 4 plodů, jejichž otec byl postižen HD, 2 plody postiženy, 1 zdravý. Nepřímá metoda spočívala v diagnostice polymorfního mikrosatelitu I1 CAHD2 exonu 1 IT15 genu. Touto metodou byl správně detekován zdravý plod, u kterého byla prokázána paternální alela neasociována s HD. U zbývajících 3 plodů tato metoda nebyla průkazná.

González-González et al., 2008 správně detekovali plod nepostižený HD nepřímou metodou, analýzou STRs v těsném vztahu s IT15 genem. Byl zvolen D4S412 STRs. Analýza otcovské DNA prokázala 238 bp alelu a 242 bp alelu, kde 242 bp alela byla analýzou postižených příbuzných prokázána jako alela ko-segregující s nemocí. Analýzou jaderné frakce DNA matky byly detekovány alely: 236 bp 246 bp. Analýza mateřské plasmy prokázala alely: 236 bp, 246 bp a paternální alelu 238 bp, tedy alelu, která nesegreguje spolu s nemocí a proto byl plod diagnostikován jako zdravý, což bylo později potvrzeno analýzou CVS.

3.4.5 Myotonická dystrofie

Myotonická dystrofie je AD onemocnění asociované s expanzí nestabilní třínukleotidové repetice CTG v 3' nepřekládaném regionu kinázy DM genu (DMPK) na chromosomu 19q13 (Brook et al., 1992). Myotonická dystrofie je multisystémové onemocnění postihující kosterní, hladké svaly, oči, srdce, endokrinní a centrální nervový systém. Dle počtu CTG repetice se rozlišuje: premutace (38-49 CTG repetice), mírná forma (50-150 CTG repetice), klasická forma (100-1000 CTG repetice) a forma kongenitální (1000-2000 CTG repetice). Závažnost postižení závisí na počtu repetice. U formy mírné je přítomná katarakta a mírná myotonie, u formy klasické katarakta, slabost, myotonie a srdeční arytmie. Nejzávažnější je postižení u kongenitální formy, která je charakterizována novorozeneckou hypotonií, respirační insuficiencí a mentální retardací (Ambler, 2004).

Amicucci et al., 2000, detekovali myotonickou dystrofii u 10-týdenního plodu analýzou mateřské plasmy, jehož otec byl postižen mírnou formou dystrofie (70 CTG repetice). CTG repetice DMPK genu byly amplifikovány metodou PCR s následnou separací amplifikovaných fragmentů elektroforeticky. U otce bylo detekováno 70 CTG repetice. Analýzou mateřské plasmy bylo detekováno 150 CTG repetice u plodu, což naznačovalo postižení plodu myotonickou dystrofií s progresí expanze repetice v porovnání s otcem. Správnost diagnózy byla potvrzena analýzou CVS, která prokázala stejné výsledky jako analýza PCR, a sice 150 CTG repetice u plodu.

3.4.6 Achondroplázie

Achondroplázie je nejčastější forma trpaslictví, spojená s disproporcími krátkými končetinami, která je způsobena bodovou mutací. Jedná se o AD dědičné onemocnění, i když většina případů je sporadických. 90 % pacientů s achondroplázií má mutaci: G→A v nukleotidu 1138 genu kódujícího receptor-3 pro fibroblastový růstový faktor (FGFR3). Druhou nejčastější mutací je G→C mutace v tom samém nukleotidu. Obě mutace v konečném důsledku vedou

k substituci argininu za glycin v pozici 380 v transmembránové doméně proteinu (FGFR3), (Shiang et al., 1994).

Saito et al., 2000 detektovali v 30. týdnu těhotenství plod postižený achondroplázií analýzou mateřské plasmy s využitím PCR a následné analýzy polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) a vizualizací výsledků elektroforeticky. Po amplifikaci FGFR3 pomocí PCR s využitím specifických primerů byly tyto podrobeny RFLP pomocí SfcI. Mutace způsobující achondroplázií vede k vytvoření nového restrikčního místa pro restrikční enzym SfcI, což vede k přítomnosti dvou extra pruhů (111bp a 55 bp) při elektroforéze. Bez přítomnosti této mutace je výsledkem restrikce pruh 166 bp. Analýza DNA matky neprokázala přítomnost mutace (pouze pruh 166 bp) a tedy přítomnost mutantní alely v plasmě matky je fetálního původu a svědčí pro postižení plodu achondroplázií. Sekvenování fragmentu potvrdilo G→A mutaci plodu. Velikostní frakcionace, zaměřená na úseky cffDNA, které jsou kratší než volné NK matky (Chan et al., 2004), umožnila efektivnější detekci G1138A mutace (Li et al., 2004).

Li et al., 2007 detekovali správně 2 plody s achondroplázií s využitím velikostní frakcionace cffDNA a MALDI-TOF MS assay. V prvním případě se jednalo o plod, jehož otec byl postižený. V druhém případě byli oba rodiče zdraví. Plod dle UZ nálezů vykazoval známky achondroplázie a následná analýza prokázala, že se jedná o de novo mutaci plodu. K detekci SNP G→A byl použit jednak homogenous MassEXTEND (hME) assay, který vede k prodlužování jak mutované fetální alely, tak nemutované alely matky, jednak single allele base extension reaction (SABER) assay, který prodlužuje pouze fetálně specifickou mutovanou alelu (Ding et al., 2004). Použití jak hME, tak SABER assay vyžaduje znalost sekvence mutované alely. Přesnější výsledky (zřetelnější píky) byly dosaženy analýzou frakcionované cffDNA dle velikosti (Chan et al., 2004).

Závěr

Ve své diplomové práci jsem se pokusil shrnout současné možnosti NIPD založené na přítomnosti cffDNA v mateřské cirkulaci. Pro využití v NIPD byly nejdříve zvažovány fetální buňky přítomné v mateřské plasmě, ale jejich nízký počet a obtíže s jejich izolací spolu s rizikem perzistence fetálních buněk řadu let po porodu s následnou možností detekce jak falešně pozitivních, tak falešně negativních výsledků nevedl k jejich významnějšímu rozšíření v NIPD.

Zlom v NIPD nastal v roce 1997 objevením přítomnosti cffDNA v cirkulaci těhotných žen. Uplatnění cffDNA v NIPD je umožněno přítomností těchto molekul v cirkulaci matky v časně fázi těhotenství - již v prvním trimestru, což umožňuje diagnostikovat řadu patologických stavů dříve než metody standardní prenatalní diagnostiky, založené na sonografickém a biochemickém nálezu s případnou následnou verifikací patologického nálezu pomocí invazivních metod. Další charakteristikou cffDNA, která ji činí ideálním materiálem k NIPD, je její kinetika v průběhu těhotenství. Objevuje se v časně fázi těhotenství a z oběhu matky je eliminována s poločasem řádově několika minut, což minimalizuje riziko perzistence těchto molekul do další gravidity v porovnání s fetálními buňkami.

Za 12 let od objevu přítomnosti cffDNA v cirkulaci matky byla provedena řada studií majících za cíl popsat jejich původ, kinetiku, kvantitativní/kvalitativní vlastnosti, clearance, jak za fyziologických, tak patologických stavů. Dále byly provedeny studie s cílem využít tyto molekuly k determinaci pohlaví plodu, RhD, RhCE statusu, chromozomálních aneuploidií a AD/AR dědičných onemocnění. V současné době klinické aplikace obsáhly metody detekující pohlaví plodu, což má význam jednak u těhotenství s rizikem X-vázaných onemocnění plodu, jednak u těhotenství s rizikem CAH, kde determinace pohlaví umožňuje rozhodnout o zahájení, resp. nezahájení terapie kortikoidy. Druhou metodou, která dosáhla klinického využití, je determinace RhD statusu plodu u RhD-negativních matek, jejichž partneři jsou heterozygotní pro RHD gen s následným rozhodnutím o podání specifické RhD profylaxe u těhotenství s rizikem aloimunizace matky, která může v další graviditě vést k HDN. RHD a RHCE genotypizace plodu má pak nesmírný význam zejména u aloimunizovaných těhotenství s aktuálním

rizikem HDN. Další metody jako detekce chromozomálních aneuploidií a AR/AD onemocnění plodu z periferní krve matky jsou zatím ve stádiu klinického výzkumu a vyžadují před jejich uvedením do klinické praxe větší počet rozsáhlejších studií, potvrzujících jejich senzitivitu a specificitu.

NIPD založena na analýze cffDNA se jeví jako perspektivní cesta k detekci řady patologií plodu prostou analýzou venózní krve matky s minimalizací rizika jak pro plod, tak pro matku, což ji činí akceptovatelnější v porovnání s invazivními metodami, které jsou spojené - i když s malým - rizikem abortu plodu.

Souhrn

Objevení cirkulujících volných fetálních nukleových kyselin v mateřské plasmě/séru v roce 1997 a průkaz relativní snadnosti a spolehlivosti, se kterou mohou být detekovány, vedl k rozvoji nových možností v rámci NIPD. NIPD umožňuje diagnostikovat určité abnormality při současné minimalizaci rizika abortu v porovnání se standardními invazivními procedurami jako je analýza choriových klků a amniocentéza. V porovnání s fetálními buňkami v mateřské cirkulaci může být cffDNA detekována dříve a ve větších množstvích než fetální buňky. Clearance cffDNA z mateřské cirkulace je rychlá a v důsledku toho se jedná o vhodný biologický materiál pro prenatalní diagnostiku bez rizika falešných výsledků ve vztahu k předchozí graviditě.

Detekce Y specifických sekvencí v mateřské plasmě má význam v prenatalní diagnostice X-vázaných onemocnění. Mimo Y chromosom byl prvním vyšetřovaným lokusem RHD gen. Jeho přítomnost svědčí pro RhD-pozitivní plod. Jiné skupiny se zaměřily na detekci chromozomálních aneuploidií (zejména trisomie 21) a paternálně zděděných mutací, způsobujících Huntingtonovu nemoc, myotonickou dystrofii, achondroplázii. Dále byly provedeny studie prokazující/vylučující CAH, β -thalessemii a cystickou fibrózu.

Klíčová slova

NIPD, cffDNA, cffRNA, Y chromosom, RHD gen, RHCE gen, chromosomální aneuploidie (trisomie 21, trisomie 18, trisomie 13), Huntingtonova nemoc, achondroplázie, myotonická dystrofie, cystická fibróza, kongenitální adrenální hyperplázie, β -thalessemie, RNA-SNP AR, RCD, EAR

Summary

The discovery of circulating cell-free fetal DNA in maternal plasma/serum, in 1997, and the demonstration of the relative easiness and reliability with which it can be detected have opened up a new possibilities for NIPD. NIPD offers diagnostics of certain abnormalities, with minimalization of the risk of abortion when compared to standard invasive procedures such as chorionic villi sampling and amniocentesis. Compared to fetal cells in maternal circulation, cffDNA in maternal plasma could be detected earlier, more frequently and in greater amounts than the cellular species. The clearance of cffDNA from maternal circulation is very rapid and therefore it is a suitable target for prenatal diagnostics without being biased by any previous pregnancies.

The detection of fetal derived Y-chromosomal sequences in maternal plasma has potential for the application in the prenatal diagnostics of X-linked disorders. Besides Y-chromosome, the first genetic locus which was examined was RHD gene. Its presence proves that the fetus is RhD-positive. Other groups have focused on the detection of chromosomal aneuploidies (mainly trisomy 21), and paternally inherited mutations causing Huntington disease, myotonic dystrophy, achondroplasia. There have also been provided studies demonstrating and/or excluding the presence of CAH, β -thalassemia and cystic fibrosis in the foetus.

Key words

NIPD, cffDNA, cffRNA, Y-chromosome, RHD gene, RHCE gene, chromosomal aneuploidies (trisomy 21, trisomy 18, trisomy 13), Huntington disease, achondroplasia, myotonic dystrophy, cystic fibrosis, congenital adrenal hyperplasia, β -thalassemia, RNA-SNP AR, RCD, EAR

Seznam použité literatury

- Alberry, M. et al.** Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trofoblast. *PRENAT DIAGN* 2007, vol. 27, p. 415-418
- Ambler, Z.** Myotonická dystrofie. *Neurologie pro praxi* 2004, vol.3, p. 142-145
- Amicucci, P. et al.** Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *CLIN CHEM* 2000, vol. 46:2, p. 301-302
- Anker, P. et al.** K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patiens with colorectal cancer. *GASTROENTEROLOGY* 1997, vol. 112, p. 1114-1120
- Bianchi, D.W. et al.** Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *PNAS* 1996, vol. 93., p. 705-708
- Bianchi, D.W.** Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *BR. J. HAEMATOL.* 1999, vol. 105, p. 574-583
- Bianchi, D.W.** Prenatal exclusion of recessively inherited disorders: Should maternal plasma analysis precede invasive techiques? *CLIN CHEM* 2002, vol. 48:5, p. 689-690
- Bianchi, D.W.** Circulating fetal DNA: Its origin and diagnostic potential-a review. *PLACENTA* 2004, vol. 18, p. 93-101
- Brook, J.D. et al.** Molecular basis of myotonic dystrophy: expansit of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *CELL* 1992, vol. 68, p. 799-808
- Bustamente-Aragones, A. et al.** Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study. *EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY* 2008, vol. 15, p- 1338-1344
- Chan, K.C.A. et al.** Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. *CLIN CHEM* 2003, vol. 49, p. 678-680
- Chan, K.C.A. et al.** Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *CLIN CHEM* 2004, vol. 50:1, p. 88-92

- Chan, K.C.A. et al.** Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. CLIN CHEM 2006, vol. 52:12, p. 1-8
- Chen, X.Q. et al.** Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. NAT MED 1996, vol. 2, p. 1033-1035
- Chim, S.S.C. et al.** Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma. PNAS 2005, vol. 102:41, p. 14753-14758
- Chim, S.S.C. et al.** Systemic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: Toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. CLIN CHEM 2008, vol. 54:3, p. 500-511
- Chinnapapagari, S.K. et al.** Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma. CLIN CHEM 2005, vol. 51, p. 652-655
- Chiu, R.W.K. et al.** Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: A feasibility study. CLIN CHEM 2002a, vol. 48:5, p. 778-779
- Chiu, R.W.K. et al.** Prenatal exclusion of β -thalassemia major by examination of maternal plasma. LANCET 2002b, vol. 360, p. 998-1000
- Chiu, R.W.K. et al.** Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. PNAS 2008, vol. 105, p. 20458-20463
- Chung, G.T.Y. et al.** Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment. CLIN CHEM 2005, vol. 51, p. 655-658
- Costa, J.M. et al.** First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. PRENAT DIAGN 2001, vol. 21, p. 1070-1074
- Costa, J.M. et al.** New strategy for prenatal diagnosis of X-linked disorders. N ENG J MED 2002, vol. 346:19, p. 1502
- Costa, J.M. et al.** Fetal RHD genotyping in maternal serum during the first trimester of pregnancy. BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY 2002, vol. 119, p. 255-260

- Daniels, G. et al.** Noninvasive prenatal diagnosis of fetal blood group phenotypes: current practice and future prospects. *PRENAT DIAGN* 2009, vol. 29, p. 101-107
- Dhallan R. et al.** Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA* 2004., vol. 291:9, p. 1114-1119
- Ding, Ch. et al.** MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis. *PNAS* 2004, vol. 101, p. 10762-10767
- Faas, B.H.W. et al.** Detection of fetal RHD-specific sequences in maternal plasma. *LANCET* 1998, vol. 352, p. 1196
- Fan, H.Ch., Quake, S.R.** Detection of fetal aneuploidy with digital polymerase chain reaction. *ANALYTICAL CHEMISTRY* 2007, p. A-D
- Fan, H.Ch. et al.** Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *PNAS Early Edition* 2008, p. 1-6
- Farina, A. et al.** Evaluation of cell-free fetal DNA as a second-trimester maternal serum marker of Down syndrome pregnancy. *CLIN CHEM* 2003, vol. 49:2, p. 239-242
- Finning, K.M. et al.** Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service. *TRANSFUSION* 2002, vol. 42, p. 1079-1085
- Finning, K.M. et al.** Fetal genotyping for the K (Kell) and Rh C,c and E blood groups on cell-free fetal DNA in maternal plasma. *TRANSFUSION* 2007, vol. 47:11, p. 2126-2133
- Flori, E. et al.** Circulating cell-free DNA in maternal serum appear to originate from cyto and syncytio-trophoblastic cells: case report. *HUM REPROD* 2004, vol. 19, p. 723-724
- Genest, D.R. et al.** Fetoplacental histology as a predictor of karyotype: a controlled study of spontaneous first trimester abortions. *HUM PATHOL* 1995, vol. 26, p. 201-209
- Gonzales-Gonzales, C. et al.** Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma. *PRENAT DIAGN* 2002, vol. 22, p. 946-948

- Gonzales-Gonzales, C. et al.** Early Huntington disease prenatal diagnosis by maternal semiquantitative fluorescent PCR. *NEUROLOGY* 2003a, vol. 60, p. 1214-1215
- Gonzales-Gonzales, C. et al.** Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *PREANT DIAGN* 2003b, vol. 23, p. 232-234
- Gonzales-Gonzales, C. et al.** Application of fetal DNA detection in maternal plasma: A prenatal diagnosis unit experience. *JOURN OF HISTOCH AND CYTOCH* 2005, vol. 53:3, p. 307-314
- Gonzales-Gonzales, C. et al.** Improvement in strategies for the noninvasive prenatal diagnosis of Huntington disease. *J ASSIST REPROD GENET* 2008, vol. 25, p. 477-481
- Halicka, H.D. et al.** Segregation of RNA and separate packing of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *EXP CELL RES* 2000, vol. 260, p. 248-256
- Herzenberg, L.A. et al.** Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescent-activated cell sorting. *PNAS* 1979, vol. 76, p. 1453-1455
- Honda, H. et al.** Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *CLIN CHEM* 2001, vol. 47:1, p. 41-46
- Honda, H. et al.** Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *HUM GENET* 2002, vol. 110, p. 75-79
- Hromadnikova, I. et al.** Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies. *BMC PREGNANCY AND CHILDBIRTH* 2002, vol. 2, p. 1-5
- Hromadnikova, I. et al.** Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases sensitivity of non-invasive fetal sex determination. *PREANT DIAGN* 2003, vol. 23, p. 235-238
- Hromadnikova, I. et al.** Non-invasive fetal RHD exon 7 and exon 10 genotyping using real-time PCR testing of fetal DNA in maternal plasma. *FETAL DIAGN THER* 2005, vol. 20, p. 275-280

- Hromadnikova, I. et al.** Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping using real-time PCR testing of maternal plasma in RhD-negative pregnancies. JOURN OF HISTOCH AND CYTOCH 2005a, vol. 53:3, p. 301-305
- Hromadnikova, I. et al.** Non-invasive fetal RHD and RHCE genotyping from maternal plasma in alloimmunized pregnancies. PREANT DIAGN 2005b, vol. 25, p. 1079-1083
- Hromadnikova, I. et al.** Quantification of fetal and total circulatory DNA in maternal plasma samples before and after size fractionation by agarose gel electrophoresis. DNA AND CELL BIOLOGY 2006, vol. 25, p. 635-640
- Hromadnikova, I. et al.** Optimalizace izolace extracelulární fetální DNA pro neinvazivní SRY, RHD a RHCE genotypizaci plodu z periferní krve těhotných žen. TRANS HEMAT DNES 2006, vol. 1, p. 26-30
- Hromadnikova, I. et al.** Non-invasive determination of fetal c and E allele of RHCE gene via real-time PCR testing of extracellular DNA extracted from maternal plasma samples using QIAamp DSP kit. J TURKISH GERMAN GYNECOL ASSOC 2007, vol. 8:2, p. 140-145
- Hromadnikova, I. et al.** Neinvazivní SRY, RHD a RHCE genotypizace plodu z periferní krve těhotných žen na 7300 real-time PCR systému. KLIN BIOCHEM METAB 2007, vol. 15(36), No. 1, p. 9-13
- Jauniaux, E. et al.** Chromosomal abnormal early ongoing pregnancies: correlation of ultrasound and placental histological findings. HUM PATHOL 1998, vol. 29, p. 1195-1199
- Kopreski, M.S. et al.** Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. CLIN CANCER RES 1999, vol. 5, p. 1961-1965
- Kuhlman, R.S. et al.** Placental histology in fetuses between 18 and 23 weeks' gestation with abnormal karyotype. AM J OBSTET GYNECOL 1990, vol. 163, p. 1264-1270
- Lau, T.W. et al.** Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. CLIN CHEM 2002, vol. 48:12, p. 2141-2146
- Leeftang, E.P.** Analysis of Germline mutation spectra at the Huntington's disease locus supports a mitotic mutation mechanism. HUM MOL GENET 1999, vol. 8, p. 173-183

- Legler, T.J. et al.** Prediction of fetal Rh D and Rh CcEe phenotype from maternal plasma with real-time polymerase chain reaction. TRANSFUSION AND APHARESIS SCIENCES 2002, vol. 27, p. 217-223
- Leung, T.N. et al.** Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour. LANCET 1998, vol. 352, p. 1904-1905
- Li, Y. et al.** Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. CLIN CHEM 2004a, vol. 50:6, p. 1002-1011
- Li, Y. et al.** Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma-case report. PRENAT DIAGN 2004b, vol. 24, p. 896-898
- Li, Y. et al.** Detection of paternally inherited fetal point mutations for β -thalassemia using size-fractionated cell-free DNA in maternal plasma. JAMA 2005, vol. 293:7, p. 843-849
- Li, Y. et al.** Non-invasive prenatal detection in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay. PRENAT DIAGN 2007, vol. 27, p. 11-17
- Lo, K.W. et al.** Analysis of cell-free Epstein-Barr virus associated RNA in the plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. CLIN CHEM 1999, vol. 45, p. 1292-1294
- Lo, Y.M.D. et al.** Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. LANCET 1989, vol. ii, p. 1363-1365
- Lo, Y.M.D. et al.** Two-way cell traffic between mother and fetus: biologic and clinical implications. BLOOD 1996, vol. 88, p. 4390-4395
- Lo, Y.M.D. et al.** Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. LANCET 1997, vol. 350, p. 485-487
- Lo, Y.M.D. et al.** Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: Implications for noninvasive prenatal diagnosis. AM J HUM GENET 1998a, vol. 62, p. 768-775
- Lo, Y.M.D. et al.** Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma. N ENG J MED 1998b, vol. 339:24, p. 1734-1738
- Lo, Y.M.D. et al.** Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. AM J HUM GENET 1999a, vol. 64, p. 218-224

- Lo, Y.M.D. et al.** Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia. CLIN CHEM 1999b, vol. 45:2, p. 184-188
- Lo, Y.M.D. et al.** Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21. CLIN CHEM 1999c, vol. 45:10, p. 1747-1751
- Lo, Y.M.D.** Fetal DNA in maternal plasma: Biology and diagnostic applications. CLIN CHEM 2000, vol. 46:12, p. 1903-1906
- Lo, Y.M.D.** Fetal DNA in maternal plasma/serum: The first 5 years. PED RES 2002, vol. 53:1, p. 16-17
- Lo Y.M.D.** Recent advances in fetal nucleic acids in maternal plasma. JOURN OF HISTOCH AND CYTOCH 2005, vol. 53(3), p. 293-296
- Lo,Y.M.D. et al.** Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. NAT MED 2007a, vol. 13:2, p. 218-223
- Lo, Y.M.D. et al.** Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. PNAS 2007b, vol. 104:32, p. 13116-13121
- Lo, Y.M.D., Chiu, R.W.K.** Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis. CLIN CHEM 2008, vol. 54:3, p. 461-466
- Marsella, R. et al.** Characterization of vesicles, containing an acylated oligopeptide, released by human colon carcinoma cells. FEBS LETT. 1989, vol. 246, p. 25-29
- Mutirangura, A. et al.** Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma. CLIN CANCER RES 1998, vol. 4, p. 665-669
- Nawroz, H. et al.** Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. NAT MED 1996, vol. 2, p. 1035-1037
- Ng, E.K.O. et al.** Presence of filterable and nonfilterable mRNA in plasma of cancer patients and healthy individuals. CLIN CHEM 2002, vol. 48, p. 1212-1217
- Ng, E.K.O. et al.** mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. PNAS 2003, vol. 100:8, p. 4748-4753
- Ohashi, Y. et al.** Quantitation of fetal DNA in maternal serum and plasma in normal and aneuploid pregnancies. HUM GENET 2001, vol. 108, p. 123-127

Oudejans, C.B.M. et al. Detection of chromosome 21-encoded mRNA of placental origin in maternal plasma. CLIN CHEM 2003, vol. 49:9, p. 1445-1449

Pertl, B. et al. Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeat. HUM GENET 2000, vol. 106, p. 45-49

Poon, L.L.M. et al. Presence of fetal RNA in maternal plasma. CLIN CHEM 2000, vol. 46:11, p. 1832-1834

Poon, L.L.M. et al. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. CLIN CHEM 2002, vol. 48:1, p. 35-41

Rosi, A. et al. RNA-lipid complexes released from maternal plasma membranes of human colon carcinoma cells. CANCER LETT 1988, vol. 39, p. 153-160

Saito, H. et al. Prenatal diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. LANCET 2000, vol. 356, p. 1170

Sekizawa, A. et al. Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum. CLIN CHEM 2001a, vol. 47:10, p. 2164-2165

Sekizawa, A. et al. Accuracy of fetal gender determination by analysis of DNA in maternal plasma. CLIN CHEM 2001b, vol. 47:10, p. 1856-1858

Sekizawa, A. et al. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. CLIN CHEM 2002, vol. 48, p. 353-354

Shiang, R. et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism: achondroplasia. CELL 1994, vol. 78, p. 335-342

Tjoa, M.L. et al. Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetal-placental DNA. THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY 2006, vol. 169:2, p. 400-404

Tong, Y.K. et al. Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: Theoretical and empirical considerations. CLIN CHEM 2006, vol. 52:12, p. 2194-2202

Tsui, N.B.Y. et al. Systematic micro-array based identification of placental mRNA in maternal plasma: towards non-invasive prenatal gene expression profiling. J MED GENET 2004, vol. 41, p. 461-467

- Tsui, N.B.Y. et al.** Detection of trisomy 21 by quantitative mass spectrometric analysis of single-nucleotide polymorphisms. CLIN CHEM 2005, vol. 51:12, p. 2358-2362
- Tsui, N.B.Y. et al.** Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. PRENAT DIAGN 2009
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W.** Digital PCR. PNAS 1999, vol. 96, p. 9236-9241
- Wataganara, T. et al.** Maternal serum cell-free fetal DNA are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18. HUM GENET 2003, vol. 112, p. 204-208
- White, P.C., Speiser, P.W.** Congenital adreanal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. ENDOCR REV 2002, vol. 21, p. 245-291
- Wolfe, A.P., Matzke, M.A.** Epigenetics: regulation through repression. SCIENCE 1999, vol. 286, p. 481-486
- Wong, I.H.N. et al.** Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. CANCER RES 1999, vol. 59, p. 71-73
- Zhong, X.Y. et al.** Detection of fetal Rhesus D and sex using fetal DNA from maternal plasma by multiplex polymerase chain reaction. BR J OBSTET GYNAECOL 2000a, vol. 107, p. 766-769
- Zhong, X.Y. et al.** Fetal DNA in maternal plasma is elevated in pregnancies with aneuploid fetuses. PRENAT DIAGN 2000b, vol. 20, p. 795-798
- Zimmermann, B. et al.** Novel real-time quantitative PCR test for trisomy 21. CLIN CHEM 2002, vol. 48:2, p. 362-363